

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

FABIANO TORRES CRUZ

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL
DA PROTEÍNA CATECOL O-METILTRANSFERASE
(COMT) COMO POTENCIAL ALVO PARA DROGAS
CONTRA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

VITÓRIA
2018

FABIANO TORRES CRUZ

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DA PROTEÍNA CATECOL O-
METILTRANSFERASE (COMT) COMO POTENCIAL ALVO PARA DROGAS
CONTRA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos

VITÓRIA
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

C957c Cruz, Fabiano Torres, 1992 -
Caracterização bioquímica e estrutural da proteína catecol o-
metiltransferase (COMT) como potencial alvo para drogas contra
paracoccidioidomicose / Fabiano Torres Cruz - 2018.
102 f. : il.

Orientador: Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves.
Coorientador: Alexandre Martins Costa Santos.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Paracoccidioides. 2. Paracoccidioidomicose. 3. Catecol O-
Metiltransferase. I. Gonçalves, Juliana Barbosa Coitinho. II. Santos,
Alexandre Martins Costa. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro
de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61


Fabiano Torres Cruz

“Caracterização bioquímica e estrutural da proteína catecol O-metiltransferase (COMT) como potencial alvo para drogas contra Paracoccidioidomicose”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.


Aprovado(a) em 28 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA:


Prof.^a Dr.^a Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves – Orientadora


Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos – Coorientador


Prof.^a Dr.^a Fabiana Vasconcelos Campos – Examinador Interno


Prof.^a Dr.^a Mariana Amália Figueiredo Costa – Examinador Externo

Vitória/ES
2018

Dedico a Deus, meus pais, meu irmão e meus amigos, por todo apoio e compreensão durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças para continuar me dedicando aos meus sonhos.

Aos meus pais Francisco e Maria da Penha e ao meu irmão Fábio, pois em todos os momentos estiveram presentes me ouvindo, aconselhando e ajudando a superar qualquer barreira.

Aos meus primos, tios e avós que também foram parte importante para todo o meu processo de formação, me apoiando de forma fundamental. Em especial Maria Helena, Antônio Carlos, Marina, Paulo César e Kaira.

A todos os meus amigos, que ao longo dessa caminhada muitas vezes entenderam minha ausência e nos momentos possíveis continuaram ao meu lado.

À minha orientadora Juliana e meu co-orientador Alexandre, que me abriram as portas do laboratório e me deram uma segunda chance para estudar e que durante todo mestrado me guiaram e me ensinaram.

Aos meus colegas do LBBMP, Evaldo, Dayanne, Antônio, Arthur, Marielly e Gustavo, que foram parte de quase todos os dias da minha vida durante os últimos dois anos e ajudaram a tornar cada dia de trabalho um bom dia a ser vivido.

Aos meus colegas de turma do mestrado, pois juntos formamos um grupo unido, um ajudando o outro a superar todas as dificuldades que o mestrado poderia oferecer.

Aos diversos laboratórios que cederam espaço, equipamentos e reagentes para a realização da pesquisa.

A Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) pelo local e estrutura para realização da pesquisa.

E à FAPES pela concessão da bolsa.

Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.

Augusto Cury (2004)

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*, é endêmica na América Latina, sendo o Brasil o país mais afetado. Atualmente, o tratamento com os antifúngicos tradicionais é usualmente longo, de alto custo, restrito a poucas classes de fármacos e com casos de resistência já relatados. A proteína catecol O-metiltransferase (COMT), que não possui estrutura resolvida em *Paracoccidioides* e nem em outros fungos, catalisa a metilação de um substrato catecol utilizando S-adenosilmetionina e íons Mg^{2+} como cofatores e parece participar de processos importantes em fungos patogênicos. Assim, sua caracterização bioquímica e estrutural poderia contribuir para o desenvolvimento de novas drogas mais efetivas para o tratamento da PCM. Para estudar a COMT, sua sequência codificadora foi clonada no vetor pET-28aTEV, que adiciona uma cauda de histidinas (His-tag) N-terminal à proteína expressa. O vetor recombinante foi então inserido nas cepas de *Escherichia coli* BL21, ArcticExpress, Rosetta e Rosetta-gami. A COMT recombinante foi expressa na fração solúvel da ArcticExpress e esta foi submetida à cromatografia de afinidade ao níquel seguida de gel filtração (colunas Ultrahydrogel e Superose 12). O Western blot com anticorpo anti-Histag marcou as duas bandas principais observadas no SDS-PAGE (30 e 60 kDa) da fração obtida após a afinidade. O perfil da gel filtração apresentou três picos principais (frações 1, 2 e 3) que, em SDS-PAGE, mostraram a presença de uma banda proeminente próxima a 60 kDa. As amostras das três frações foram utilizadas em ensaio de atividade para avaliar o consumo de catecol a 35 °C e pH 7,5 sendo que a fração 2 apresentou maior relação atividade/quantidade de proteína. Cálculos teóricos das massas referentes aos picos da cromatografia de gel filtração indicam que a COMT se comporta como um dímero. A fração 2, apesar de não estar pura, foi submetida a ensaio de desnaturação térmica, onde um processo de agregação ou desnaturação foi detectado em temperaturas acima de 320 K (~47 °C). O dicróismo circular da fração 2 indicou um perfil de α -hélice e folhas- β diferente de outras COMT. Um modelo *in silico* também foi gerado e os dados estruturais obtidos podem contribuir como guia para futuras caracterizações bioquímicas.

PALAVRAS-CHAVE: *Paracoccidioides*, Paracoccidioidomicose, PCM, catecol O-metiltransferase, COMT.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis caused by fungi of the genus *Paracoccidioides*, is endemic in Latin America, with Brazil being the most affected country. Currently, treatment with traditional antifungals is usually long, costly, restricted to a few classes of drugs and with cases of resistance already reported. The catechol O-methyltransferase (COMT) protein, which has no structure solved in *Paracoccidioides* or other fungi, catalyzes the methylation of a catechol substrate using S-adenosylmethionine and Mg^{2+} ions as cofactors and appears to participate in important processes in pathogenic fungi. Thus, its biochemical and structural characterization could contribute to the development of new and more effective drugs for the treatment of PCM. To study COMT, its coding sequence was cloned into the pET-28aTEV vector, which adds an N-terminal histidine-tag (His-tag) to the expressed protein. The recombinant vector was then inserted into the strains of *Escherichia coli* BL21, ArcticExpress, Rosetta and Rosetta-gami. Recombinant COMT was expressed in the soluble fraction of ArcticExpress and it was subjected to nickel affinity chromatography followed by gel filtration (Ultrahydrogel and Superose 12 columns). Western blot with anti-Histag antibody showed the two major bands observed on SDS-PAGE (30 and 60 kDa) of the fraction obtained after affinity. The gel filtration profile showed three main peaks (fractions 1, 2 and 3) which, on SDS-PAGE, showed the presence of a prominent band near 60 kDa. Samples from the three fractions were used in an activity assay to evaluate the catechol consumption at 35 °C and pH 7.5, and fraction 2 showed a higher activity/protein ratio. Theoretical calculations of the masses of gel filtration chromatography peaks indicate that COMT behaves as a dimer. Fraction 2, although not pure, was subjected to thermal denaturation test, where a process of aggregation or denaturation was detected at temperatures above 320 K (~47 ° C). Circular dichroism of fraction 2 indicated an α -helix and β -sheet profile different from other COMT. An *in silico* model has also been generated and the structural data obtained can contribute as a guide for future biochemical characterization.

KEY WORDS: *Paracoccidioides*, Paracoccidioidomycosis, PCM, catechol O-methyltransferase, COMT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa das regiões endêmicas de PCM de acordo com o grau de incidência entre os anos de 2012 e 2017.....	23
Figura 2. Lesões causadas pela PCM.....	25
Figura 3. Cronograma de tratamento para PCM.....	28
Figura 4. Estrutura química de antifúngicos tradicionais.....	29
Figura 5. Distribuição geográfica das espécies de Paracoccidioides na América do Sul.....	32
Figura 6. Linhagens filogenéticas do fungo Paracoccidioides.....	33
Figura 7. O fungo dimórfico Paracoccidioides.....	34
Figura 8. Ciclo biológico hipotético do fungo Paracoccidioides.....	34
Figura 9. Estrutura geral das enzimas MTases.....	39
Figura 10. Reação catalisada pela COMT.....	40
Figura 11. Esquema da catálise realizada pela COMT.....	41
Figura 12. Desenho esquemático do vetor pET28a(TEV) – 5369 pb.....	44
Figura 13. SDS-PAGE 12 % da expressão heteróloga e lise de COMT em E. coli BL21.....	55
Figura 14. SDS-PAGE 12 % da expressão heteróloga e lise de COMT em E. coli Rosetta.....	57
Figura 15. SDS-PAGE 12 % da expressão heteróloga e lise de COMT em E. coli Rosetta-gami.....	59
Figura 16. SDS-PAGE 12 % da expressão heteróloga por 24 h e lise de COMT em E. coli ArcticExpress.....	61

Figura 17. SDS-PAGE 12 % da expressão heteróloga por 67 h e lise de COMT em E. coli ArcticExpress.....	61
Figura 18. OD600 ao longo do tempo na expressão de COMT em ArcticExpress....	62
Figura 19. SDS-PAGE 12 % da expressão heteróloga de COMT em E. coli ArcticExpress com e sem a presença de etanol.....	63
Figura 20. Cromatografia de afinidade por níquel da fração solúvel de COMT expressa em ArcticExpress (Eluição linear com gradiente crescente de imidazol)...	64
Figura 21. Cromatografia de afinidade por níquel da fração solúvel de COMT expressa em ArcticExpress (Eluição com 500 mmol.L ⁻¹ de imidazol).....	65
Figura 22. SDS-PAGE 12 % das diferentes eluições por cromatografias de afinidade por níquel realizadas para COMT.....	66
Figura 23. Western blot utilizando anticorpo Anti-His para a expressão e purificação da proteína recombinante COMT.....	68
Figura 24. Gráfico Kav versus log da massa molecular para calibração da coluna Ultrahydrogel 250 da Waters para HPLC.....	70
Figura 25. Perfil da purificação da proteína COMT por cromatografia de gel filtração utilizando a coluna Ultrahydrogel 250.....	71
Figura 26. SDS-PAGE 12 % das frações obtidas na cromatografia de gel filtração com coluna Ultrahydrogel 250.....	72
Figura 27. Perfil da purificação da proteína COMT por cromatografia de gel filtração utilizando a coluna Superose 12.....	73
Figura 28. SDS-PAGE 12 % das frações obtidas na cromatografia de gel filtração com coluna Superose 12.....	74
Figura 29. Desnaturação térmica da enzima COMT a 0,17 mg.mL ⁻¹ , em 100 mmol.L ⁻¹ NaCl e 10 mmol.L ⁻¹ MgCl ₂ 100 mmol.L ⁻¹ Tris pH 8,0.....	78

Figura 30. Dicroísmo circular da fração 2 da COMT obtida na cromatografia de gel filtração.....	79
Figura 31. Molécula de SAM.....	83
Figura 32. Predição das interações entre a molécula de SAM e os aminoácidos da COMT de Paracoccidioides.....	85
Figura 33. Predição das interações entre o íon de Mg^{2+} e os aminoácidos da COMT de Paracoccidioides.....	85
Figura 34. Modelos obtidos no I-TASSER para COMT de Paracoccidioides.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Potenciais alvos de drogas no gênero <i>Paracoccidioides</i>	37
Tabela 2. Comparação entre os volumes de eluição dos picos da Superose 12 e as massa dos padrões.....	74
Tabela 3. Ensaio enzimático para COMT (Ensaio 1).....	75
Tabela 4. Ensaio enzimático para COMT (Ensaio 2).....	76
Tabela 5. Ensaio enzimático para COMT (Ensaio 3).....	77
Tabela 6. Porcentagem de estruturas secundárias da COMT.....	80
Tabela 7. Código PDB e pontuação das proteínas selecionadas pelo BLAST para o alinhamento.....	81
Tabela 8. Predição de domínio e famílias pelo BLAST.....	82
Tabela 9. Aminoácidos conservados na COMT de <i>Paracoccidioides</i>	82
Tabela 10. Interações preditas entre os cofatores e a proteína COMT de <i>Paracoccidioides</i>	84
Tabela 11. Número e localização das estruturas secundárias preditas.....	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequência de aminoácidos da proteína COMT.....	44
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC: *ATP-binding cassette*

AmB: Anfotericina B

BIOEST: Laboratório de Biologia Estrutural

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

CAE: COMT ArcticExpress

CBL: COMT BL21

CDR: *Candida Drug Resistance*

COMT: Catecol O-metiltransferase

CRO: COMT Rosetta

CRG: COMT Rosetta-gami

DHFR: Dihidrofolato redutase

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DRLS: 6,7-dimetil-8-ribitilumazina sintase

DTT: Ditioneitol

EUA: Estados Unidos da América

Hsp: *Heatshock protein*

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

LABIOM: Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares

LB: Luria-Bertani

LBBMP: Laboratório de Bioquímica e Biofísica Molecular de Proteínas

LEC: Laboratório de espectroscopia e calorimetria

LN BIO: Laboratório Nacional de Biociências

LNMC: Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental

LQP: Laboratório de Química de Proteínas

MB-COMT: COMT ligada a membrana

MDR: *Multidrug Resistance*

MIF: Fator inibidor da migração de macrófagos

mRNA: RNA mensageiro

MSF: *Major facilitator superfamily*

MTase: Metiltransferase

HUCAM: Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes

PABA: Ácido p-aminobenzóico

Pb: *Paracoccidioides brasiliensis*

PCM: Paracoccidioidomicose

PDH: Prefenato desidratase

PDT: *Pleiotropic Drug Resistance*

PI: *Paracoccidioides lutzii*

PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonilo

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

SAH: S-adenosil-homocisteína

SAM: S-adenosilmetionina

S-COMT: COMT solúvel

SDS: Dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio

SMC: Sítio múltiplo de clonagem

TBS: Solução salina tamponada com Tris

TEMED: Tetrametiletilenodiamina

tRNA: RNA transportador

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

RNA: Ácido ribonucleico

Abreviações (em uma e três letras) dos resíduos de aminoácidos

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Aspartato
E	Glu	Glutamato
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. Geral	22
2.2. Específicos	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1. Paracoccidioidomicose	23
3.1.1. Diagnóstico	26
3.1.2. Tratamento	28
3.1.3. Resistência	31
3.2. O gênero <i>Paracoccidioides</i>	33
3.3. Proteínas com interesse biotecnológico	37
3.4. Catecol O-metiltransferase (COMT)	39
4. METODOLOGIA	44
4.1. Clonagem da sequência codificadora da COMT	44
4.2. Expressão heteróloga	46
4.2.1. Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	46
4.2.2. Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> Rosetta(DE3) e <i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami(DE3)	47
4.2.3. Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> ArcticExpress(DE3)	47
4.2.4. Expressão com adição de etanol	48
4.3. Lise bacteriana	48
4.4. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	48
4.5. <i>Western Blot</i>	49
4.6. Purificação da proteína recombinante	50
4.6.1. Cromatografia por afinidade	50
4.6.2. Cromatografia por gel filtração	51
4.7. Caracterização bioquímica e biofísica	52
4.7.1. Ensaio enzimático (espectrofotometria UV/UV-Vis)	52
4.7.2. Desnaturação térmica	53
4.8. Dicroísmo circular	53
4.9. Análise estrutural <i>in silico</i>	54
4.9.1. Alinhamento local	54
4.9.2. Predição estrutura secundária	54
4.9.3. Modelagem da proteína	54

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1. Expressão heteróloga.....	55
5.1.1. Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	55
5.1.2. Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> Rosetta(DE3).....	57
5.1.3. Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami(DE3).....	59
5.1.4. Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> ArcticExpress(DE3)	60
5.1.5. Expressão com adição de etanol	63
5.2. Purificação da proteína recombinante	64
5.2.1. Cromatografia por afinidade	64
5.2.2. Cromatografia por gel filtração.....	70
5.3. Caracterização bioquímica e biofísica	76
5.3.1. Ensaio enzimático.....	76
5.3.2. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da proteína	78
5.4. Caracterização estrutural	79
5.4.1. Dicroísmo circular	79
5.5. Estudos de bioinformática da proteína COMT	81
5.5.1. Alinhamento local.....	81
5.5.2. Predição da estrutura secundária	86
5.5.3. Modelagem molecular.....	87
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
6.1. Expressões heterólogas.....	89
6.2. Purificações	90
6.3. Atividade enzimática	91
6.4. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da proteína	91
6.5. Dicroísmo circular.....	91
6.6. Análise <i>in silico</i>	91
7. CONCLUSÕES	93
8. PERSPECTIVAS.....	94
9. REFERÊNCIAS.....	95
APÊNDICE A	102

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Paracoccidioidomicose (PCM), reportada pela primeira vez por Adolpho Lutz em 1908 (LUTZ, 1908), caracteriza-se por ser uma micose sistêmica granulomatosa endêmica causada pelos fungos do gênero *Paracoccidioides* (TABORDA et al., 2015). Esta micose é uma das micoses mais importantes da América Latina, cuja região endêmica estende-se do sul do México ao norte da Argentina, sendo mais prevalente no Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina. Entre as regiões endêmicas, o Brasil é o país mais afetado pela PCM com mais de 12 mil casos reportados (MARTINEZ, 2017).

O tratamento da PCM é realizado com antifúngicos tradicionais (sulfonamidas, anfotericina B e azóis) e, geralmente, tem duração de mais de 1 ano para casos leves e de mais de 2 anos para casos mais moderados. Além do longo período de tratamento, essas drogas apresentam outros problemas associados como alto custo, efeitos colaterais. Novas drogas têm sido sugeridas na literatura, porém nenhuma delas está disponível no mercado, o que se torna um problema ainda maior devido à resistência que o fungo começa a apresentar em relação aos antifúngicos tradicionais. Além disso, como esses antifúngicos atuais visam apenas três caminhos metabólicos, é preferencial que novas drogas busquem por outras alternativas e uma das formas para a busca desses novos alvos é o desenho de medicamentos com base na estrutura bioquímica do alvo (SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014).

Em relação à descoberta de novos alvos, Desjardins e colaboradores (2011) selecionaram 38 genes presentes em três cepas de *Paracoccidioides* (Pb01, Pb03 e Pb18) com base no potencial de seus produtos gênicos como alvos de drogas devido sua localização ou conservação em outros agentes patogênicos. Dentre essas proteínas, está a catecol-O-metil transferase (COMT).

Diferentes metiltransferases de fungos tiveram algumas funções atribuídas. Vesper (1987) indicou a possibilidade da COMT de *Candida tropicalis* estar envolvida na regulação do transporte de cátions bivalentes através do sistema de membranas e, também, na transição micélio-levedura. Awerbeck et al. (1999) relatou a possibilidade

de uma O-metiltransferase estar protegendo o fungo *Podospora anserina* contra o estresse oxidativo. E Kinnings et al. (2009) estudando novos fármacos para o fungo *Micobacterium tuberculosis* observou que inibidores da COMT humana também agem na enzima 2-trans-enoil-ACP(CoA) redutase responsável pela biossíntese da parede celular deste fungo.

Além desses fatores, o banco de dados PDB (*Protein Data Bank* – www.rcsb.org) mostra trinta estruturas tridimensionais de COMT depositadas até o momento de diferentes espécies, no entanto, nenhuma é fúngica.

Assim, como as funções da COMT no fungo *Paracoccidioides* e sua estrutura ainda são desconhecidas e essa enzima parece desempenhar papéis importantes na sobrevivência de outros fungos, sua caracterização bioquímica e estrutural pode fornecer bases importantes para um tratamento mais efetivo contra a PCM e, até mesmo, outras micoses.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Caracterizar estrutural e bioquimicamente a proteína recombinante COMT, que pode estar envolvida na virulência dos fungos do gênero *Paracoccidioides* e, que também pode ser um potencial alvo para drogas contra a micose Paracoccidioidomicose.

2.2. Específicos

- Expressar e purificar a proteína COMT recombinante;
- Caracterizar bioquimicamente a proteína recombinante no que diz respeito à sua estrutura secundária e estado de agregação;
- Caracterizar cineticamente a proteína COMT;
- Realizar estudos de bioinformática para auxiliar na condução de experimentos de inibição.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Paracoccidioidomicose

A Paracoccidioidomicose (PCM), reportada pela primeira vez por Adolpho Lutz em 1908 (LUTZ, 1908), caracteriza-se por ser uma micose sistêmica granulomatosa endêmica causada pelos fungos do gênero *Paracoccidioides* (TABORDA et al., 2015).

A infecção com *Paracoccidioides* ocorre em mamíferos e é adquirida pela via respiratória após inalação de conídios suspensos no ar. Mesmo após a infecção, é possível que o organismo não venha a desenvolver a doença. Neste caso, existe a presença do fungo latente em lesões pulmonares residuais e nódulos linfáticos mediastinais (MARTINEZ, 2015).

Em adultos, a PCM manifesta-se como uma infecção pulmonária crônica e progressiva, assemelhando-se clinicamente à tuberculose com a qual é confundida em 10 % dos casos (FIGUEROA et al., 1995).

Os pacientes com PCM, na maioria das vezes, são do sexo masculino (10 a 30 homens afetados para cada mulher), trabalhadores de zonas rurais, fumantes, alcoólatras e pessoas com alguma outra doença (imunossupressão) (TAVARES et al., 2015).

A PCM é uma das micoses mais importantes da América Latina, cuja região endêmica estende-se do sul do México ao norte da Argentina, sendo mais prevalente no Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina. Essas regiões endêmicas, porém, não são afetadas por igual, sendo as áreas agrícolas, úmidas, de alta pluviosidade, temperatura moderada e com presença de rios e florestas mais favoráveis ao desenvolvimento do fungo (MARTINEZ, 2017). Outro fator importante para determinação das áreas endêmicas são os registros dos casos da doença, que nem sempre ocorrem, visto que a PCM não é uma doença de notificação obrigatória no Brasil (MARTINEZ, 2017; WANKE, 2009).

Em 2012, Peçanha (2012) classificou as regiões endêmicas como de baixa, moderada e alta incidência (**Figura 1**). Já em 2017, Martinez (2017) atualizou o

mapa da região, classificando-a como de alta (primeiras áreas de endemia conhecidas e novas áreas), moderada, crescente (novas áreas) e baixa endemia (antigas e novas áreas) (**Figura 1**). O aumento das áreas endêmicas de 2012 para 2017 reflete não somente a progressão da doença, mas também, a maior preocupação em registrar e ter controle dos casos de PCM. Isso demonstra que, ao decorrer dos anos, a doença tem se tornado cada vez mais relevante, existindo, inclusive, propostas para desenvolver um sistema de vigilância da PCM de modo a determinar a real magnitude da infecção e torná-la de notificação obrigatória em todo o país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

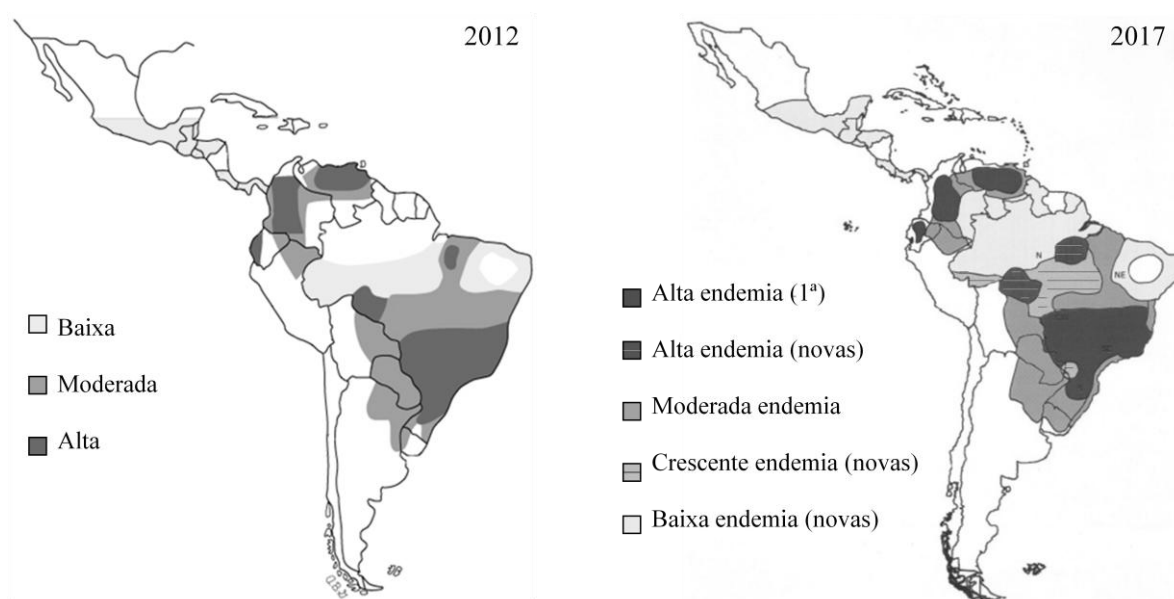


Figura 1. Mapa das regiões endêmicas de PCM de acordo com o grau de incidência entre os anos de 2012 e 2017. O mapa de 2012 classifica as regiões de acordo com o grau de baixa, moderada e alta incidência da doença (PEÇANHA, 2012). O mapa de 2017 classifica as regiões de acordo com o grau de alta endemia (primeiras áreas de endemia conhecidas), alta endemia (novas áreas), moderada endemia, crescente endemia (novas áreas), baixa endemia (antigas e novas áreas) (MARTINEZ, 2017). Pode ser observado um aumento das áreas endêmicas da doença de 2012 para 2017.

Entre as regiões endêmicas, o Brasil é o país mais afetado pela PCM com mais de 12 mil casos reportados (MARTINEZ, 2017). No país, entre o período de 1986 a 2006, a PCM causou 51 % do total do número de mortes por infecções fúngicas (PRADO, 2009). Entre 2002 e 2004, a taxa de mortalidade por PCM no Brasil foi, em média, de 1 morte/milhão de habitante, sendo que a região Centro-Oeste respondeu pela maior taxa (2,1 mortes/milhão de habitantes) (MARTINEZ, 2017).

Ainda segundo Martinez (2017), a região sudeste apresenta o maior número de casos reportados de PCM entre 1998 e 2006, sendo São Paulo o estado mais afetado. Para o Espírito Santo, os estudos realizados em relação à PCM ainda são poucos.

Vieira (1979, apud SANTOS et al., 2003) realizou um estudo na zona rural do município de Colatina com teste intradérmico da paracoccidioidina (filtrado ou suspensão do fungo) entre alunos e funcionários de um colégio agrícola e entre habitantes nas proximidades, encontrando uma taxa de 20,05 % de reatores.

Santos et al. (2003), por sua vez, investigaram a influência do tabagismo e do alcoolismo no desenvolvimento da forma crônica da PCM em estudo realizado no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Foram avaliados 81 pacientes com PCM atendidos no Serviço de Doenças Infecciosas do HUCAM, no período de julho de 1999 a julho de 2000. Destes, nove apresentaram quadro clínico compatível com a forma aguda, dois apresentaram co-infecção com HIV e os outros setenta pacientes estavam com a forma crônica da paracoccidioidomicose. Os resultados encontrados também apontaram uma chance de adoecer 14 vezes maior entre os fumantes e 3,6 vezes maior entre os que bebiam acima de 50 g.dia⁻¹ de álcool.

No mesmo hospital, uma análise do prontuário de 546 pacientes atendidos no período de 1978 a 2012 foi realizada por Peçanha (2012). Esses pacientes tiveram o diagnóstico de PCM aguda/subaguda e crônica confirmado por meio de identificação do agente em espécimes clínicos, exames histopatológicos e sorológicos. Destes, a maioria era de adultos, lavradores do sexo masculino e a forma crônica da PCM foi a mais frequente (mais que 88 %). Além disso, a maior prevalência da doença ocorreu nos municípios do interior do estado, com tradição de cultivo de café.

A PCM manifesta-se de formas variadas, mas a classificação clínica é dividida, na maioria das vezes, em dois tipos: aguda ou crônica. Uma maneira mais elaborada de classificar as formas clínicas da PCM foi proposta por Franco et al. (1987) e adaptada por Marques (2013). Nesta classificação, as formas clínicas da PCM são divididas em quatro grupos sendo o grupo 1 (PCM - infecção) correspondente aos pacientes sem sinais e sintomas da doença, mas com teste de pele para

paracoccidioidina positivo; o grupo 2 (PCM – doença), dividido em dois subgrupos: 2.1 - forma aguda/subaguda, que normalmente afeta pacientes com menos de 30 anos com tropismo fúngico para linfonodos, fígado, baço e medula óssea e 2.2 - forma crônica, que afeta adultos de maneira unifocal (um órgão ou sistema) ou multifocal (mista); grupo 3, que representa a PCM associada à imunossupressão e, por último, o grupo 4, que inclui pacientes com sequelas, especialmente doença pulmonar obstrutiva crônica, estenose e obstrução das vias aéreas superiores e insuficiência adrenal. A **Figura 2** apresenta exemplos das lesões causadas pela PCM.

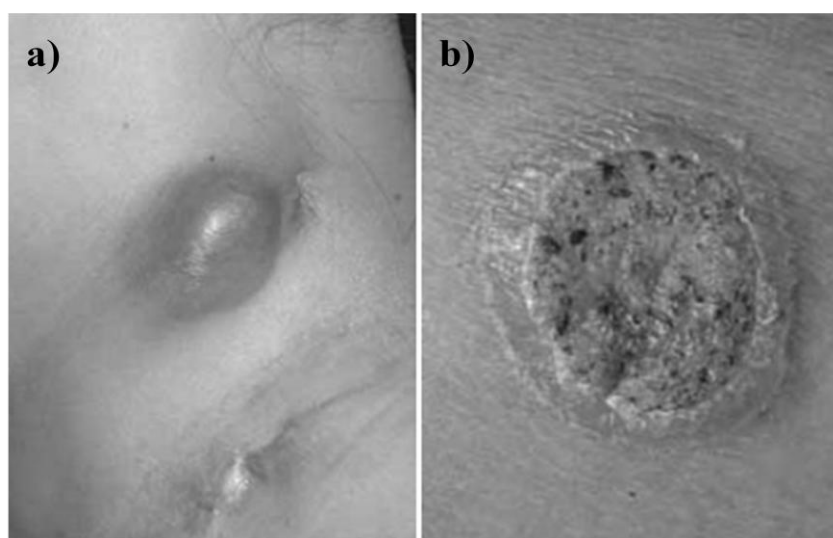


Figura 2. Lesões causadas pela PCM. a) paciente portador de PCM na forma aguda mostrando linfonodo dilatado, com aspecto inflamatório e formação de abscesso (classificação 2.1.); b) paciente portador de PCM na forma crônica, com granuloma na pele (classificação 2.2.). Adaptado de Fortes, et al. (2011).

Por ser uma micose sistêmica, a PCM pode comprometer vários órgãos, sendo os pulmões o órgão mais afetado pela doença e um dos primeiros a entrar em contato com o agente patogênico após a infecção. Outros órgãos também afetados são linfonodos, baço, fígado e até mesmo o sistema nervoso central (MENDES, 2005).

3.1.1. Diagnóstico

Os diferentes tipos de diagnóstico para PCM diferenciam-se não só pela técnica utilizada, mas também, pela fonte da amostra e o momento do tratamento em que o paciente se encontra, que vai desde a identificação até a cura aparente da doença.

O diagnóstico micológico utilizando amostras clínicas (saliva fresca, lesões, aspirado de linfonodos ou fragmentos de biópsias) é considerado o padrão ouro para o diagnóstico de PCM (MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Esse teste é realizado através da observação do fungo (que possui uma morfologia distinta) nas amostras clínicas utilizando microscópio óptico (LACAZ et al., 2002).

O teste histopatológico é realizado através da coloração do fungo em tecidos e esfregaços utilizando um reagente específico (metanina de prata) (GROCOTT, 1995). Esse tipo de teste apresentou uma sensibilidade de 96,7 % em 239 amostras analisadas no Hospital Universitário da Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo (MORETO et al., 2011).

Os testes sorológicos baseiam-se em investigar a presença de anticorpos ou de antígenos utilizando técnicas como precipitação em ágar gel (imunodifusão dupla), imunofluorescência indireta, ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e *Western blot* (MENDES et al., 2017). Entre os alvos, destacam-se a glicoproteína 43 (gp43), reconhecida como o principal antígeno em testes de diagnóstico (PUCCIA et al., 1986; CARVALHO et al., 2008), além da proteína Gp70 (DA SILVA et al., 2004), do antígeno de 87kDa (DÍEZ et al., 2002) e das proteínas Pb27 e Pb40 (FERNANDES et al., 2011a). Essas proteínas podem ser utilizados não só para o diagnóstico (com altas taxas de sensibilidade e especificidade), mas também para avaliar o progresso do tratamento, a recorrência da doença (MARQUES, 2012) e como adjuvante do tratamento (FERNANDES et al., 2011b e c)

Apesar das altas taxas de sensibilidade e especificidade dos testes de imunodiagnóstico, diferentes espécies de *Paracoccidioides* causadoras da PCM podem responder de forma diferente quando o antígeno utilizado não é comum a todas as espécies. Por exemplo, anticorpos anti-Gp43 não foram detectados no soro de um paciente com PCM disseminada (VIDAL et al., 2005); antígenos das espécies de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* levaram a diferentes respostas humorais em PCM crônica (LENHARD-VIDAL et al., 2013). Assim, buscar antígenos com baixa variabilidade genética nas espécies de *Paracoccidioides* que sejam expressos em todos os isolados ou mesmo usar uma mistura de antígenos de diferentes espécies pode contribuir para minimizar essas diferentes respostas.

Os métodos moleculares permitem a identificação do fungo sem a necessidade de cultura. São rápidos, altamente específicos e sensíveis. O fungo *P. brasiliensis* já foi identificado utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores para sequências específicas codificadoras de proteínas desse fungo (GOLDANI & SUGAR, 1998; GOMES et al., 2000), como a Gp43 (BIALEK et al., 2000).

Além dos métodos de diagnóstico já descritos, o envolvimento pulmonar deve ser investigado em todos os casos utilizando diferentes técnicas de diagnóstico por imagem, no entanto, as imagens radiológicas da pneumonia podem ser semelhantes à PCM (MARQUES, 2012).

Contudo, esses diversos diagnósticos para PCM podem apresentar desvantagens. Por exemplo, as diferenças entre as linhagens de *Paracoccidioides* que contribuem para dificultar um diagnóstico universal para a doença. Também existem as possibilidades de algumas reações inespecíficas resultarem em falso positivo ou negativo. E por último, o alto custo de alguns diagnósticos impossibilita que estes se tornem de prática comum em laboratórios para atendimento da população em geral (MENDES et al., 2017).

3.1.2. Tratamento

O tratamento da PCM é realizado com antifúngicos tradicionais e, geralmente, tem duração de mais de 1 ano para casos leves e de mais de 2 anos para casos mais moderados.

Para entender como é realizado o tratamento, é importante saber, primeiramente, sobre os parâmetros para avaliação da cura do paciente, que são: cura clínica (quando os sinais e sintomas da doença já não estão presentes e há normalização da taxa de sedimentação de eritrócitos); cura micológica (quando há resultados negativos para investigação micológica de *Paracoccidioides*); cura radiológica (quando o padrão radiológico pulmonar se torna estável após o tratamento) e cura imunológica. Quando o paciente obtém esses quatro parâmetros de cura por dois anos sem tratamento complementar, diz-se que foi obtida a cura aparente. A cura é dita aparente porque os focos com fungos latentes certamente permanecem no corpo mesmo após um tratamento eficaz (MENDES et al., 2017).

O tratamento é dividido em um período de tratamento inicial e outro, de tratamento complementar. Durante o período de tratamento inicial, os pacientes são submetidos a avaliações clínicas, sorológicas, hematológicas, bioquímicas e radiológicas uma vez por mês até que obtenham cura clínica e taxa normal de sedimentação de eritrócitos. Durante o tratamento complementar, os pacientes são submetidos a avaliações clínicas, sorológicas e radiológicas a cada 3 meses, até um ano após a cura sorológica (**Figura 3**) (MENDES et al., 2017).

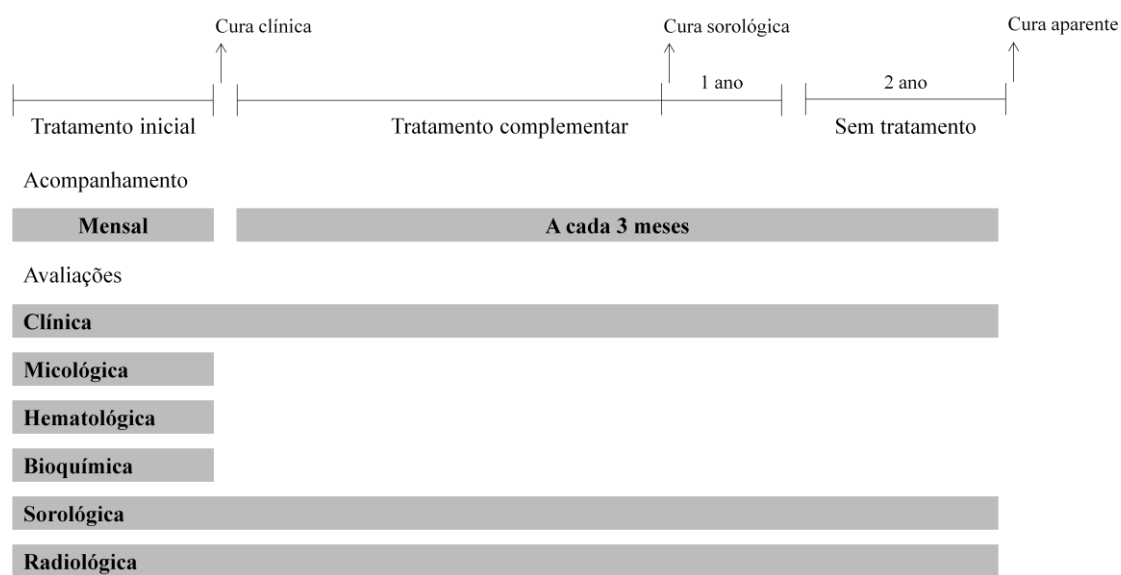


Figura 3. Cronograma de tratamento para PCM. No tratamento inicial são realizadas 6 avaliações mensais: clínica, micológica, hematológica, bioquímica, sorológica e radiológica. Depois de confirmada a cura clínica, o tratamento complementar tem início. No tratamento complementar, são realizadas avaliações clínica, sorológica e radiológica. Quando a cura sorológica é mantida pelo período do 1 ano, o paciente então entra no período de observação para a cura aparente. O paciente obtém a cura aparente caso mantenha todos os resultados negativos para PCM nas avaliações (clínica, sorológica e radiológica) durante 2 anos sem tratamento. Adaptado de Mendes (2017).

De maneira que os tratamentos iniciais e complementares necessitam da utilização de antifúngicos, alguns são comumente propostos. Dentre os mais utilizados estão as sulfonamidas, anfotericina B (AmB) e os derivados de azóis (**Figura 4**).

A classe das sulfonamidas, composta por esse fármaco e seus derivados, previne a utilização, pelo fungo, do ácido p-aminobenzóico (PABA) na síntese do ácido fólico (necessário para síntese de precursores de DNA e RNA). A sulfodiazina, principal derivado de sulfonamida utilizado, possui a vantagem de ter um baixo custo, ser rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e altamente distribuída pelo corpo. No entanto, sua posologia (2 ou 3 doses de 500 mg a cada 6 horas, ou 100 mg.kg^{-1} por dia, com máximo de 6 g) junto com seus efeitos adversos (reações de

hipersensibilidade, sintomas gastrointestinais, anemia hemolítica e outros) são desvantagens importantes. Para tratamentos por longos períodos, de 6 a 12 meses são requeridos para indução e 12 a 24 meses para manutenção do tratamento (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

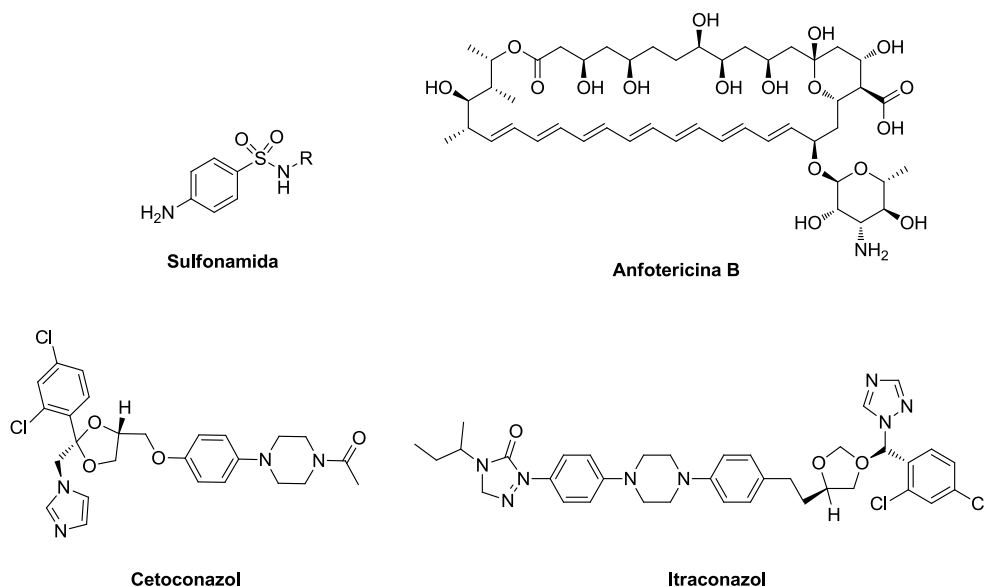


Figura 4. Estrutura química de antifúngicos tradicionais. São apresentadas as moléculas de sulfonamida e anfotericina B e, para os azóis, as moléculas de cetoconazol e itraconazol. Todos têm sido utilizados no tratamento da PCM, sendo que a maior variabilidade de fármacos disponíveis é da classe dos azóis (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Já a AmB atua ligando-se e alterando especificamente o ergosterol da membrana das células do fungo, o que acarreta em uma mudança de permeabilidade levando à perda de potássio e moléculas pequenas. O principal modo de administração dessa droga é por via intravenosa. As doses iniciais variam de 5 a 10 mg, mas em casos severos a dose total deve ser aumentada para 1 mg.kg⁻¹ por dia. Os efeitos adversos imediatos são febre, calafrios, taquicardia, taquipneia, hiperpneia, hipertensão arterial ou hipotensão, além da nefrotoxicidade (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

Contudo, os tratamentos mais efetivos têm utilizado os derivados de imidazol como cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol (MENDES, 2017) que atuam inibindo a biossíntese de ergosterol em diferentes etapas. O ergosterol é o maior componente da membrana celular dos fungos, essencial para biorregular a fluidez, assimetria e integridade da membrana (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). O itraconazol, que tem obtido melhores resultados, tem sido principalmente utilizado

em doses de 200 mg por dia no tratamento de PCM leve a moderada (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Ele apresenta efeitos adversos como náuseas, vômitos, aumento de transaminases séricas, erupção cutânea, hipocalcemia, hipertrigliceridemia e hiperuricemia são facilmente controlados (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

Apesar de essas três classes apresentarem as opções tradicionais de antifúngicos para PCM, no ano de 2008, San-Blas e colaboradores (2008) já alertavam para a necessidade da pesquisa por agentes quimioterápicos novos e mais efetivos contra *P. brasiliensis* com pouco ou nenhum efeito colateral, visto que as drogas atuais (sulfonamidas, AmB e azóis) apresentam muitos problemas associados como longo tempo e alto custo do tratamento, efeitos colaterais e resistência iminente. Desde então (2008 para 2018) não foram muitas as opções de fármacos que entraram no mercado, mas muitas alternativas têm surgido nas bibliografias.

Cloroquina, pentoxifilina, paracoccidina e ciclosporina são drogas alternativas que têm apresentado resultados promissores no tratamento da PCM (revisado por GOLDANI; WIRTH, 2017). Além disso, o uso de proteínas do fungo (como P10, Pb27 e Pb40) em imunoterapia também tem apresentado atividade fungicida significativa (revisado por GOLDANI; WIRTH, 2017). Porém, nenhuma das opções está disponível para uso clínico como antifúngico. O fato dessas novas alternativas de tratamento não estarem entrando no mercado como opções disponíveis para pacientes com PCM consiste um problema ainda maior devido à resistência que o fungo começa a apresentar em relação aos antifúngicos tradicionais.

3.1.3. Resistência

Apesar da disponibilidade de agentes antifúngicos, a crescente incidência de micoses, a alta taxa de mortalidade e a complexidade do tratamento podem ser atribuídas principalmente ao surgimento de resistência aos antifúngicos tradicionais, especialmente em pacientes com a imunidade comprometida (SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014).

Estudando diferentes isolados de *P. brasiliensis*, Restrepo e Arando (1980), encontraram um número pequeno, embora importante, de isolados resistentes às

sulfonamidas. Hann e colaboradores (2003) relataram um isolado de *P. brasiliensis* resistente a cetoconazol e à associação trimetopim/sulfonamida.

Costa et al. (2005) realizaram um estudo de transcriptoma em *P. brasiliensis* para encontrar neste organismo genes ortólogos de transportadores envolvidos na resistência de outros fungos. Ao fim do estudo, os autores conseguiram identificar 22 genes relacionados aos transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) e quatro que provavelmente codificam para MSF (*Major facilitator superfamily*), ambos transportadores que conferem resistência por possibilitarem a saída de alguns antifúngicos do ambiente celular.

Entre os prováveis transportadores presentes em *P. brasiliensis* encontrados no estudo estão: dois *Candida Drug Resistance* (CDR1 e CDR2 de *Candida albicans* – classe ABC); um *Multidrug Resistance* (MDR1, também de *Candida albicans* – classe MSF); e um de *Pleiotropic Drug Resistance* (PDR5 de *Saccharomyces cerevisiae* – classe ABC), todos estes envolvidos na resistência a azóis, principal classe de fármaco para o tratamento de PCM (COSTA et al., 2005).

Além dos transportados que possibilitam o efluxo do fármaco, outros mecanismos podem existir para que o fungo desenvolva resistência. Fatores como alterações fenotípicas no sítio do alvo farmacológico, recombinações genômicas que minimizam o efeito tóxico do fármaco e formação de biofilme também são mecanismos de resistência dos fungos (SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014). A formação de biofilmes, por exemplo, também já foi confirmada *in vitro* para *Paracoccidioides* (OLIVEIRA et al., 2015).

Assim, apesar dos relatos de fungos *Paracoccidioides* (e de outros fungos) com mecanismos de resistência para o tratamento com antifúngicos, são poucas as classes de fármacos disponíveis. Mesmo com vários estudos para a produção de novos fármacos, o processo é difícil principalmente porque as células fúngicas, sendo organismos eucarióticos como os mamíferos, compartilham diversas semelhanças, levando à escassez de alvos específicos que possam ser explorados para o desenvolvimento de drogas antifúngicas. Reflexo disso, é que existem hoje principalmente quatro classes de antifúngicos que visam apenas três caminhos metabólicos, o que torna de extrema urgência a busca por novos alvos. Uma das

formas para a busca desses novos alvos é o desenho de medicamentos com base na estrutura bioquímica do alvo (SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014).

3.2. O gênero *Paracoccidioides*

O gênero *Paracoccidioides* pertence ao filo Ascomycota, da ordem Onygenales e família Onygenaceae. Dentro do gênero *Paracoccidioides* existe a divisão em cinco linhagens filogenéticas distintas (PS2, PI, S1, PS3 e PS4), sendo que as linhagens PS2, S1, PS3 e PS4 pertencem à espécie *Paracoccidioides brasiliensis* e a linhagem PI pertence à espécie *Paracoccidioides lutzii* (homenagem a Dr. Adolpho Lutz). A linhagem S1 ainda é subdividida em dois grandes grupos: S1a e S1b. A **Figura 5** mostra a distribuição geográfica das espécies de *Paracoccidioides* (MUÑOZ, 2016).

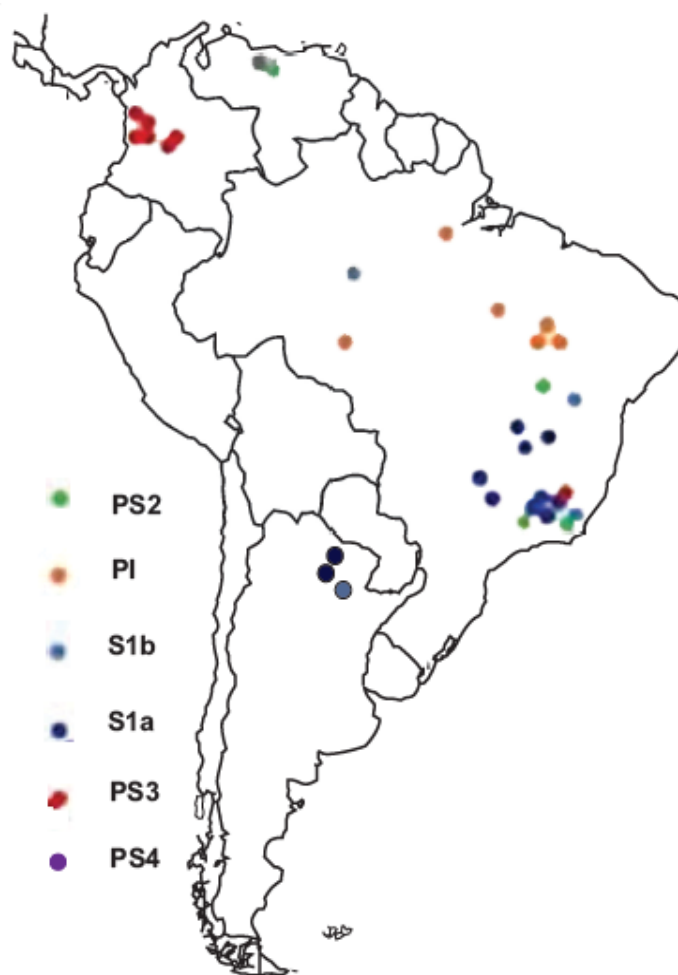


Figura 5. Distribuição geográfica das espécies de *Paracoccidioides* na América do Sul. S1 (azul), que é dividido em dois grupos S1a (azul escuro) e S1b (azul claro), PS2 (verde), PS3 (vermelho), PS4 (roxo) e PI (laranja). Adaptado de Shikanai-Yasuda (2017, apud MUÑOZ, 2016).

Além da subdivisão das espécies em linhagens, as próprias linhagens possuem subdivisões internas (**Figura 6**) que apresentam cepas representativas. Sendo assim, a cepa Pb18 representa a linhagem S1, a cepa Pb03 representa a PS2, a cepa PbChn representa a PS3, a cepa Pb300 representa a PS4 e a cepa Pb01 representa a linhagem PI (MUÑOZ, 2016). Dentre estas cepas, a Pb18, a Pb03 e Pb01 tiveram seus genomas sequenciados por Desjardins et al. (2011).

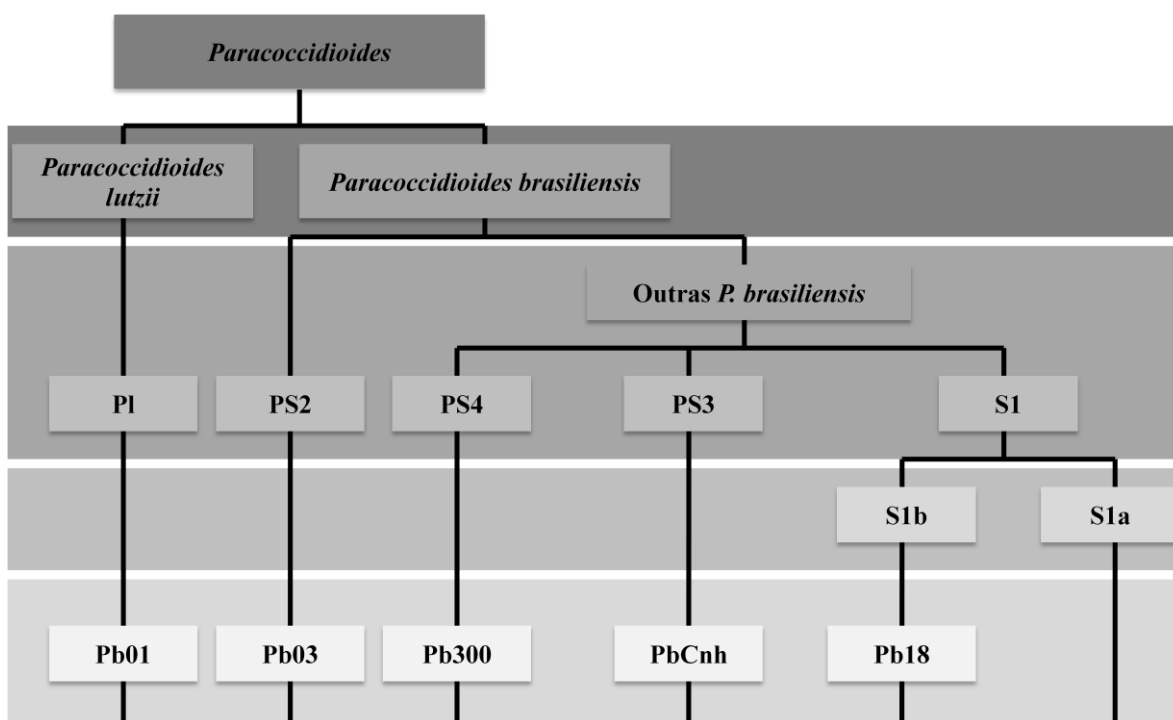


Figura 6. Linhagens filogenéticas do fungo *Paracoccidioides*. Os gêneros de *Paracoccidioides* são divididos em *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. O gênero *P. brasiliensis* possui 4 linhagens diferentes: S1, PS2, PS3 e PS4. A linhagem S1 ainda é subdividida em S1a e S1b. Dentre as linhagens, existem cepas representativas: Pb01 para PI, Pb03 para PS2, Pb300 para PS4, PbChn para PS3 e Pb18 para S1 (MUNOZ, 2016).

Em relação às características morfológicas, os fungos do gênero *Paracoccidioides* são dimórficos e sua mudança de fase é acarretada pela mudança na temperatura do ambiente. Em ambientes com temperaturas próximas a 25 °C, o fungo é caracterizado por uma fase de micélio, constituída por hifas (**Figura 7a**). Nesta fase, encontram-se os conídios (esporos) que são inalados pelo hospedeiro para que ocorra a infecção. Com o aumento da temperatura do ambiente para aproximadamente 37 °C (temperatura corporal), o fungo sofre uma mudança da fase de micélio para levedura (**Figura 7b**) e, no caso da infecção, os conídios inalados sofrem a mudança de fase dentro do hospedeiro, sendo a fase de levedura responsável pela patogenicidade do fungo (TAVARES et al., 2015).

A mudança de fase que o fungo sofre com a variação da temperatura é uma das etapas de seu ciclo biológico, representado no esquema hipotético da **Figura 8** (BAGAGLI, 2008).

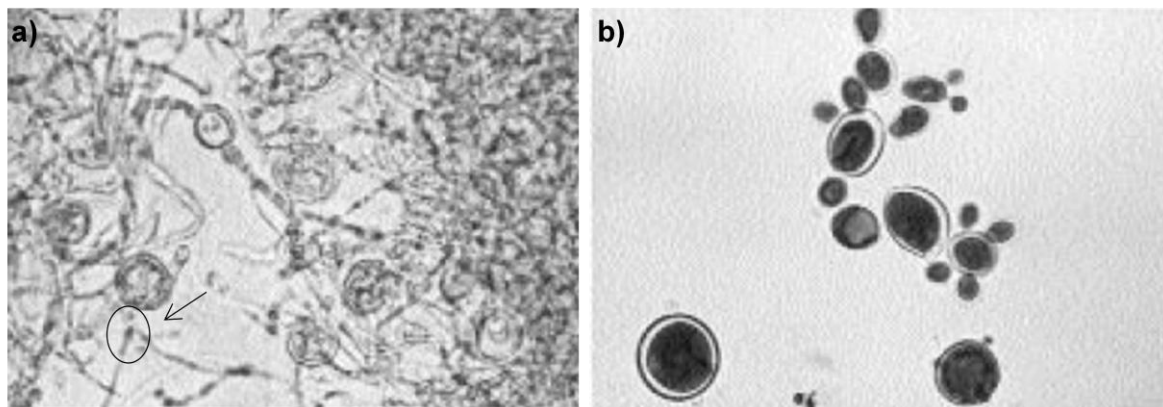


Figura 7. O fungo dimórfico *Paracoccidioides*. a) *Paracoccidioides* na fase de micélio, encontrado em temperaturas próximas a 25 °C. As regiões como a de destaque (círculo indicado pela seta) são os conídios atuantes no processo de infecção. b) *Paracoccidioides* na fase de levedura, com formato típico de roda de leme, encontrado em temperaturas próximas a 37 °C. Esta é a forma patogênica do fungo. Adaptado de Corredor et al. (1999).

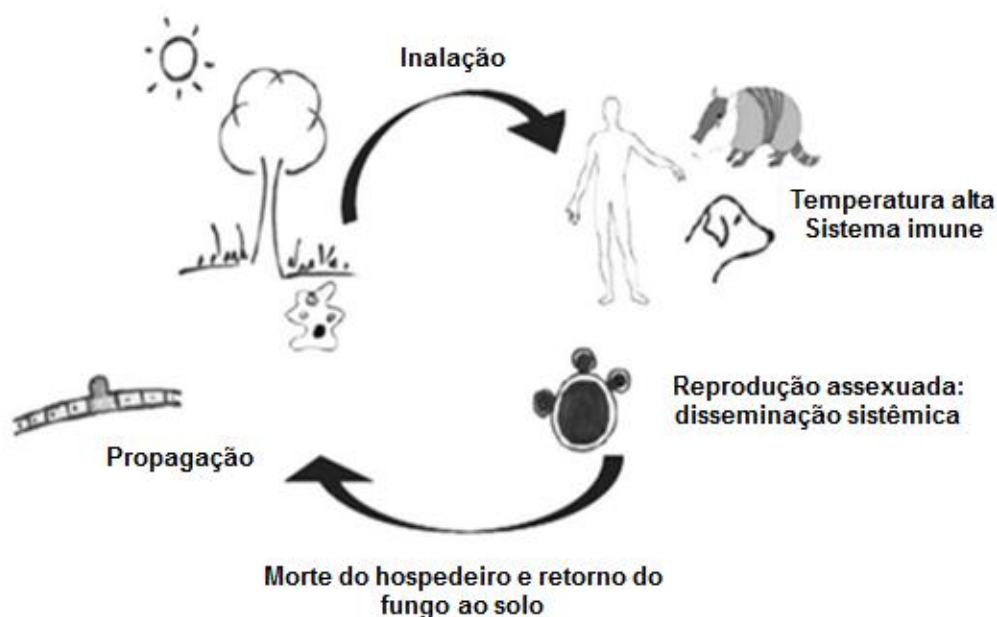


Figura 8. Ciclo biológico hipotético do fungo *Paracoccidioides*. O ciclo biológico do *Paracoccidioides* inicia-se no solo, onde os esporos desenvolvem-se e podem ser inalados pelo hospedeiro. No hospedeiro, o fungo pode se proliferar, ficar em estado de latência ou ser destruído com tratamento adequado. Imagem adaptada de Bagagli et al. (2008).

O ciclo começa com o fungo na fase de micélio encontrado no solo, local onde o fungo está exposto a diversos fatores ecológicos como radiação solar, precipitação, competição com outros organismos, predadores, textura do solo e diversidade de

compostos químicos. Caso as condições sejam propícias para a proliferação do fungo, ele pode sobreviver e infectar um hospedeiro (BAGAGLI et al., 2008). Os tatus são uns dos mamíferos mais afetados pela infecção por *Paracoccidioides*. Locais com numerosas populações desses animais são considerados pontos com alta probabilidade de detecção do fungo (TAVARES et al., 2015).

A infecção tem início quando o esporo é inalado e a temperatura corporal do hospedeiro (em torno de 37 °C), que causa estresse físico na célula do fungo, influencia sua mudança para a fase de levedura, na qual o fungo pode permanecer em período de latência (hospedeiro imunocompetente) ou, caso o organismo esteja imunossuprimido, o fungo poderá se disseminar pelo o organismo e causar a doença PCM. (BAGAGLI et al., 2008).

O fungo *Paracoccidioides* pode se reproduzir (reprodução assexuada) dentro do organismo até que ocorra a morte do hospedeiro (caso o hospedeiro seja tratado adequadamente o ciclo é encerrado). Após a morte do hospedeiro, o fungo volta para o solo, podendo estar em uma região geográfica diferente devido à sua movimentação. Se o ambiente for favorável para sobrevivência do fungo, esse sofrerá a mudança para a fase de micélio (temperatura ambiente) para, novamente, voltar a se reproduzir no ambiente (reprodução sexuada) e o ciclo ser reiniciado (BAGAGLI et al., 2008).

Dentro deste ciclo biológico, a passagem do fungo por um organismo e a mudança geográfica são fatores que podem contribuir para um processo de seleção onde haverá o aumento da virulência do *Paracoccidioides* (BAGAGLI et al., 2008).

A transição morfológica, além da alteração na composição e estrutura dos carboidratos da parede celular, também é precedida por outras alterações moleculares (SAN-BLAS, G., NINO-VEGA, 2001). Genes envolvidos no catabolismo de aminoácidos, metabolismo da parede celular, resposta ao estresse oxidativo e síntese de proteínas mostraram-se diferentemente expressos durante essa transição (BASTOS et al., 2007). Por exemplo, várias proteínas relacionadas ao choque térmico/estresse oxidativo são expressas preferencialmente na transição micélio-levedura, incluindo a Hsp88, Hsp90 e as isoformas de Hsp70 (REZENDE et al., 2011).

3.3. Proteínas com interesse biotecnológico

Em 2011, Desjardins e colaboradores (DESJARDINS et al., 2011) sequenciaram o genoma de três cepas de *Paracoccidioides*. Duas cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb03 e Pb18) e uma cepa de *Paracoccidioides lutzii* (Pb01). Em uma das análises realizadas pelos pesquisadores, eles selecionaram 38 genes presentes nas 3 cepas de *Paracoccidioides*, baseados no seu potencial como alvo de droga devido sua localização ou conservação em outros agentes patogênicos. As 38 possíveis proteínas derivadas desses genes são listadas na **Tabela 1**.

Todas as sequências gênicas dessa tabela foram analisadas por nosso grupo utilizando o servidor XtalPred (<http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>). Esse servidor faz uma predição da facilidade de cristalização de proteína combinando oito características diferentes que influenciam a cristalização (tamanho, ponto isoelétrico, índice de hidrofobicidade/hidrofilicidade – *gravity index*, regiões desordenadas, índice de instabilidade, porcentagem de estruturas *coil*, *coiled coil* e índice de inserção em membrana) em uma única pontuação, onde as proteínas são classificadas em cinco classes: ótima (1), sub-ótima (2), média (3), difícil (4) e muito difícil (5) (SLABINSK et al., 2007). Informações adicionais da proteína são descritas no APÊNDICE A.

O XtalPred ainda fornece a classificação das proteínas de acordo com dois métodos: o método EP é feito pela combinação individual das probabilidades de cristalização calculadas para as oito características proteicas mencionadas anteriormente; o método RF adiciona outras quatro características preditas: razão entre a área de superfície (soma das acessibilidades ao solvente dos resíduos individualmente) e a área total estimada da proteína, hidrofobicidade da superfície, entropia da cadeia lateral de resíduos da superfície e composição de aminoácidos da superfície predita da proteína.

Após estes testes *in silico*, cinco proteínas foram inicialmente selecionadas por nosso grupo de pesquisa dentre todas que foram analisadas: prefenato desidratase (PDH), 6,7-dimetil-8-ribitilumazina sintase (DRLS), dihidrofolato redutase (DHFR), fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) e catecol O-metiltransferase (COMT).

Tabela 1. Potenciais alvos de drogas no gênero *Paracoccidioides*. Proteínas encontradas como potenciais alvos de drogas no genoma das espécies Pb03, Pb18 e Pb01. Em negrito, estão destacados os alvos escolhidos inicialmente para o presente estudo. Tabela adaptada de Desjardins et al. (2011).

Produto gênico	Categoria	Pb01	Pb03	Pb18
α -1,3- glicana sintase mok11	Parede celular	PAAG_03297	PABG_00726	PADG_03169
Exo- β -1,3-glucanase	Parede celular	PAAG_03359	PABG_07048	PADG_06465
Endo-1,3(4)- β -glucanase	Parede celular	PAAG_03880	PABG_00905	PADG_03375
Glicanase	Parede celular	PAAG_02542	PABG_05882	PADG_06864
α -1,2-manosiltransferase	Parede celular	PAAG_05421	PABG_05957	PADG_06770
α -1,6- manosiltransferase Och1	Parede celular	PAAG_07836	PABG_07755	PADG_08248
Quitinase	Parede celular	PAAG_03849	PABG_00883	PADG_03347
Dolicol fosfato-D-manose:proteína O-D- manosiltransferase	Parede celular	PAAG_07032	PABG_03036	PADG_01561
Erg25 ergosterol biossíntese	Parede celular	PABG_00691	PADG_03128	PAAG_03253
Erg28 ergosterol biossíntese	Parede celular	PAAG_03696	PABG_00752	PADG_03199
Aspartate-semialdeído desidrogenase (ASADH)	Via metabólica	PAAG_08065	PABG_07306	PADG_08376
β -N-acetilhexosaminidase	Parede celular	PADG_06728	PABG_05994	PAAG_05380
Prefenato desidratase (PDH)	Via metabólica	PAAG_07380	PABG_05562	PADG_05878
6,7-dimetil-8-ribitilumazina sintase (DRLS)	Via metabólica	PAAG_00851	PABG_01387	PADG_03983
Tioesterase superfamília	Via metabólica	PAAG_06629	PABG_02647	PADG_01085
Adenosina deaminase	Via metabólica	PAAG_00523	PABG_06782	PADG_02162
GMP sintase	Via metabólica	PAAG_02333	PABG_04834	PADG_05472
Dihidrofolato redutase (DHFR)	Via metabólica	PADG_05351	PAAG_08913	PABG_07774
Álcool desidrogenase	Via metabólica	PAAG_08248	PABG_03450	PADG_02018
F1F0 ATP sintase mitocondrial	Via metabólica	PAAG_02265	PABG_04772	PADG_05402
Metalopeptidase	Via metabólica	PAAG_07202	PABG_02532	PADG_00962
Ubiquitina-específica protease	Via metabólica	PADG_04938	PAAG_05092	PABG_04542
Proteína da família da ubiquitina	Via metabólica	PAAG_05332	PABG_06039	PADG_06675
VeA (<i>RYP2/RYP3</i>)	Outro	PAAG_03070	PABG_00531	PADG_02949
VosA	Outro	PAAG_02671	PABG_03151	PADG_01695
VelB	Outro	PAAG_06081	PABG_06575	PADG_08037
LaeA	Outro	PAAG_05395	PABG_05982	PADG_06744
<i>RYP1</i>	Outro	PAAG_03579	PABG_06919	PADG_06243
Citocromo P450	Outro	PAAG_01848	PABG_02127	PADG_00528
Anidrase carbônica	Outro	PAAG_05716	PABG_06289	PADG_07674
Tirosina fosfatase	Outro	PAAG_04037	PABG_03867	PADG_07313
Fator inibidor de migração de macrófago (MIF)	Outro	PAAG_01158	PABG_01732	PADG_03671
Fosfolipase D	Outro	PAAG_02042	PABG_02293	PADG_00705
Ribonuclease D – subunidade	Outro	PAAG_04510	PABG_04292	PADG_04671
Domínio PDZ (também conhecido como DHR or GLGF)	Outro	PAAG_04650	PABG_04416	PADG_04809
Tirosinase	Outro	PAAG_01024	PABG_01611	PADG_03805
RNA polimerase DNA-direcionada	Outro	PAAG_00396	PABG_06677	PADG_02279
RNA polimerase RNA-direcionada	Outro	PABG_03975	PADG_07439	PAAG_04185
Acetiltransferase (GNAT) família	Outro	PADG_05962	PAAG_06044	PABG_05634
Catecol O-metiltransferase (COMT)	Outro	PAAG_04909	PABG_00243	PADG_02644
Uricase	Outro	PAAG_01437	PABG_01949	PADG_00331
Lipase (classe 3)	Outro	PAAG_00013	PABG_05054	PADG_07242

Além da facilidade de cristalização predita pelo servidor XtalPred, também foram avaliadas, manualmente, as seguintes características dessas proteínas:

1. Similaridade de estrutura primária com proteínas humanas (utilizando o BLASTPp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>);
2. Disponibilidade de ensaio funcional relativamente mais simples (ensaio enzimático, por exemplo);
3. Estrutura tridimensional já resolvida em fungos do gênero *Paracoccidioides* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>);
4. Características funcionais interessantes como, por exemplo, já ser alvo de medicamentos antifúngicos.

Após todos estes processos, uma das proteínas selecionadas foi a catecol O-metiltransferase (COMT).

3.4. Catecol O-metiltransferase (COMT)

Em 1958, surgiu a primeira descrição de uma reação de O-metilação de catecolaminas e outros catecóis catalisada por uma enzima (AXELROD; TOMCHICK, 1958). Depois disso, mais 36 anos se passaram até a publicação da primeira estrutura cristalográfica de uma catecol O-metiltransferase (COMT de fígado de rato) recombinante (VIDGREN; SVENSSON; LILJAS, 1994).

Em 2018, pesquisa no banco de dados PDB (Protein Data Bank - www.rcsb.org) mostra 30 estruturas tridimensionais de COMT depositadas, sendo 21 são de *Rattus norvegicus* (mamífero), 6 de *Streptomyces peucetius* (planta), duas de *Mendicago sativa* (bactéria) e uma humana (mamífero). Outras estruturas estão disponíveis, mas são variações nas sequências dessas proteínas ou das condições de cristalização. Importante de se notar é que ainda não existem cristais para COMT de fungos.

Enzimas do tipo catecol O-metiltransferase (COMTs) fazem parte de uma classe de proteínas conhecidas como metiltransferases (MTases) dependentes de S-adenosilmetionina (SAM) (CHENG; BLUMENTHAL, 1999). As enzimas dessa classe diferenciam-se de acordo com o átomo do substrato que sofrerá a metilação (oxigênio, nitrogênio, enxofre, carbono, iodo, bromo, cloro ou arsênio) e, apesar

desses diferentes nucleófilos, todas as metilações parecem ocorrer por substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) (COWARD, 1971; COWARD, 1977).

Além do semelhante mecanismo de reação, essas enzimas compartilham uma estrutura central comum, com uma folha- β de sete fitas com configuração $6\uparrow 7\downarrow 5\uparrow 4\uparrow 1\uparrow 2\uparrow 3\uparrow$ que forma uma estrutura aberta do tipo sanduiche $\alpha/\beta/\alpha$, enquanto a estrutura total tem um dobramento do tipo *Rossmann* (**Figura 9**) (FAUMAN; BLUMENTHAL; CHENG, 1999). Essa configuração de centro para direita (1 até 3) e depois centro para esquerda (4 até 6) é responsável por criar uma fenda central onde ocorre a ligação do substrato (BRÄNDÉN, 1980; SWINDELLS, 1993).

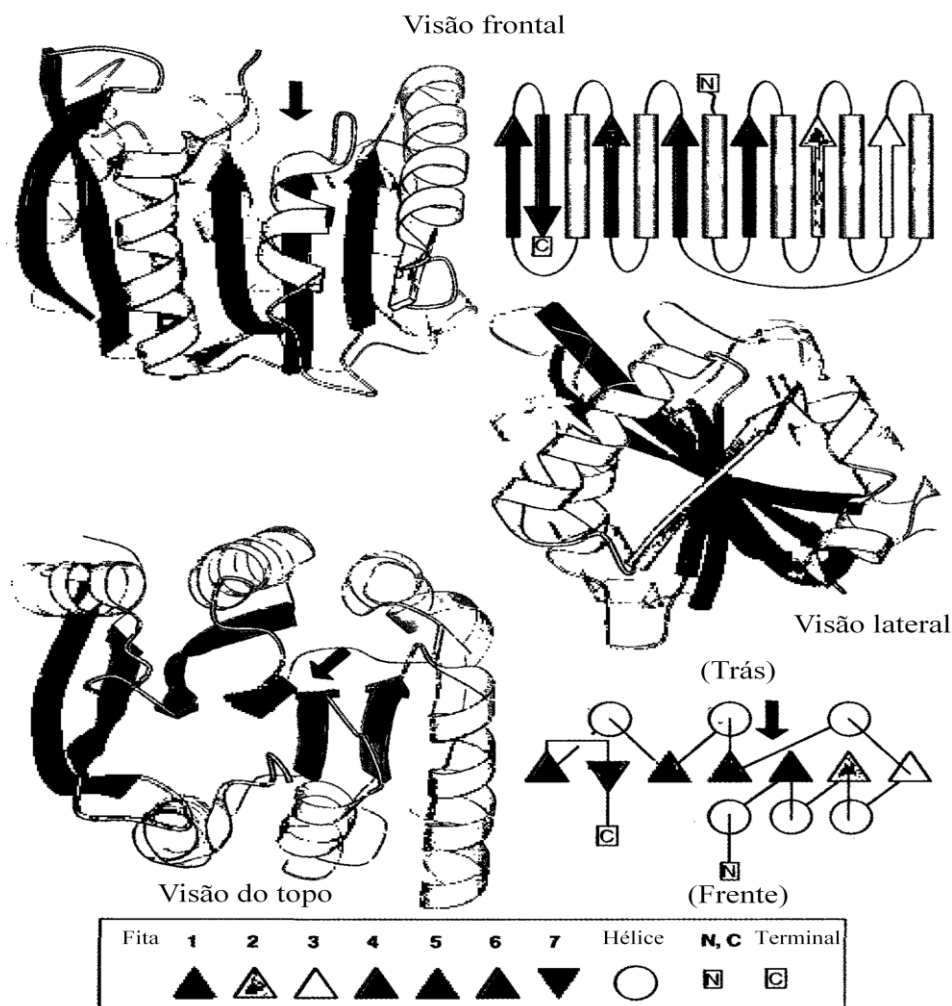


Figura 9. Estrutura geral das enzimas MTases. A figura apresenta a região frontal, lateral e do topo das enzimas MTases. Os triângulos representam fitas da folha- β e os círculos representam as α -hélices. A seta preta na estrutura junto com os dois primeiros triângulos pretos (1 e 4) representam a região de formação da fenda. N e C representam a região N-inicial e a C-terminal da proteína. A proteína modelo utilizada neste caso é a COMT de código PDB 1VID (VIDGREN; SVENSSON; LILJAS, 1994). Imagem adaptada de Fauman e colaboradores (VIDGREN; SVENSSON; LILJAS, 1994).

Em todas as MTases uma ou duas hidroxilas da ribose (presente na SAM) interagem por ponte de hidrogênio com a cadeia lateral ácida de um aminoácido (Asp ou Glu) localizado no final da cadeia 2', chamada de *D-loop*. Outros dois resíduos conservados são uma Gly (*G-loop*) e o aminoácido no topo da cadeia 4' (em casos como da COMT, uma Val). As glicinas permitem interações de hidrogênio entre sua cadeia principal e o grupamento amino da metionina na SAM, enquanto o aminoácido no topo da cadeia 4' faz uma interação de hidrogênio entre sua cadeia lateral e o carboxilato da metionina da SAM. As pontes de hidrogênio realizadas entre os átomos N1 e N2 da adenina vêm do *loop* seguindo a cadeia 3' (FAUMAN; BLUMENTHAL; CHENG, 1999). Apesar das estruturas serem semelhantes para todas as subfamílias das MTases, isso não é refletido na conservação das sequências (que tende a ser semelhante somente dentro das subfamílias) (FAUMAN; BLUMENTHAL; CHENG, 1999).

Especificamente, as COMTs estão presentes em uma variedade de organismos como bactérias, fungos, invertebrados e vertebrados, onde podem existir sob a forma solúvel (S-COMT) e ligada à membrana (MB-COMT) e possuem outras características como especificidade para substrato, propriedades cinéticas e tamanho que as diferem das outras proteínas da classe das MTases (VIDGREN et al., 1999). Essas enzimas catalisam a metilação de um grupo fenol do substrato catecol utilizando SAM (S-adenosilmetionina) e Mg^{2+} como cofatores (**Figura 10**).

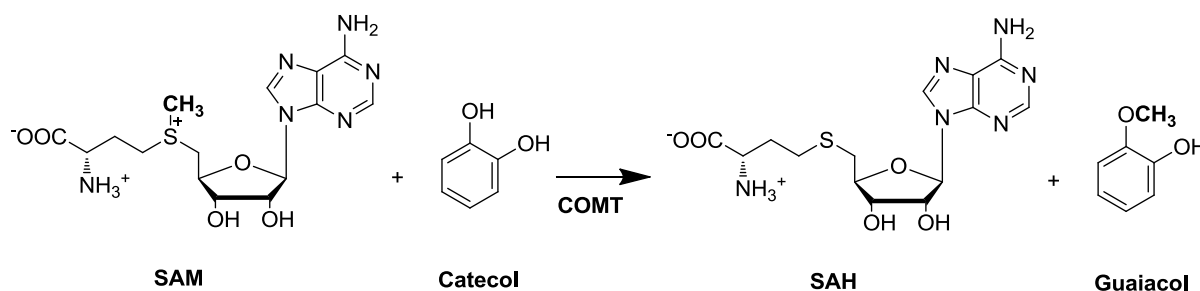


Figura 10. Reação catalisada pela COMT. Exemplo de reação catalisada pela enzima COMT. A enzima catalisa a metilação de um grupo fenol do substrato catecol. SAM (S-adenosilmetionina); SAH (S-adenosil-homocisteína).

COMTs possuem alto grau de similaridade de sequência primária, sendo que as diferenças podem ser encontradas em regiões de ligação do substrato ou na âncora sinal (VIDGREN et al., 1999). Porém, a COMT de *Paracoccidioides* não possui muita similaridade com a COMT humana, em relação às outras COMTs.

Segundo Vidgren (1999), essas enzimas são constituídas de duas partes distintas, a fenda mais profunda para ligação da SAM e a região de ligação do substrato e catálise, com o Mg^{2+} localizado ao centro. Para a ligação da SAM e liberação da SAH, a enzima precisa sofrer uma mudança conformacional.

Durante a catálise, primeiro ocorre a ligação da SAM, depois o Mg^{2+} (outros cátions divalentes já foram reportados) e por último o substrato (**Figura 11**). A formação de um produto formado com um metil *meta* ou *para* é dependente do substrato, sendo que somente uma das posições pode ser metilada após a ligação do substrato.

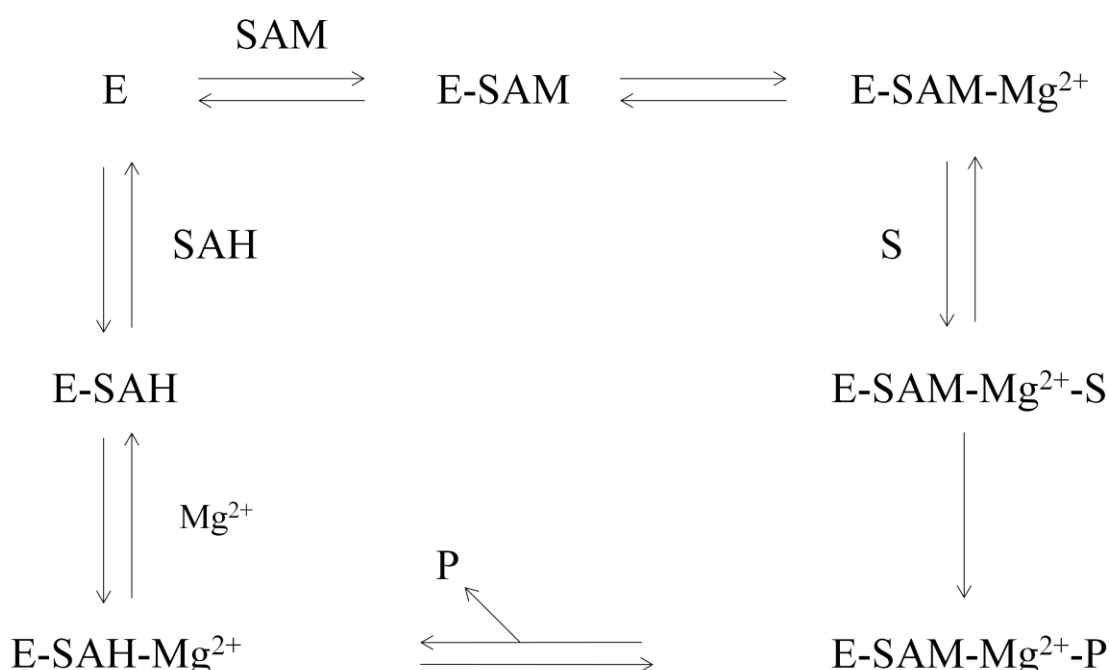


Figura 11. Esquema da catálise realizada pela COMT. Primeiro ocorre a interação da SAM (S-adenosilmetionina) com a enzima (E). Em segundo passo, o Mg^{2+} também interage com a enzima. Após os dois cofatores interagirem com a enzima, o substrato (S) se liga e a catálise ocorre com posterior formação do produto (P). A SAM perde o grupamento metil, se tornando uma molécula de S-adenosil-homocisteína (SAH). Por fim, o Mg^{2+} e depois a SAH deixam enzima. A enzima fica livre novamente para realizar o processo de catálise (VIDGREN et al., 1999).

Em relação à velocidade, o *turnover* dessas enzimas é considerado baixo e a etapa determinante da reação é a transferência do metil, que ocorre via um encaixe justo e simétrico de um estado de transição S_N2 . Para chegar a essa etapa, um próton que é retirado de uma das hidroxilas do catecol é responsável por iniciar a reação sendo o Mg^{2+} necessário para a ligação do substrato (**Figura 11**) (VIDGREN et al., 1999).

Diferentes metiltransferases de fungos tiveram algumas funções atribuídas. Vesper (1987) realizou estudos de cinética e inibição da proteína COMT no fungo *Candida*

tropicalis e observaram que a proteína está presente na membrana celular e na parte exterior da parede celular. Os resultados indicaram a possibilidade de a COMT estar envolvida na regulação do transporte de cátions bivalentes através do sistema de membranas, devido a característica quelante dos OH nos substratos de catecol e os grupos sulfidrilas reativos no sítio catalítico. Essa COMT também parece estar envolvida na transição micélio-levedura, pois um meio deficiente de Mg^{2+} e SAM intracelular previne a transição normal de levedura para micélio.

Averbeck et al. (1999) estudaram, no fungo *Podospora anserina*, o gene *PaMTH1* que codifica uma proteína O-metiltransferase dependente de SAM. Esta proteína apresentou alto percentual de homologia com a COMT da planta *Vitis vinífera*. Os resultados demonstraram que esta proteína do fungo parece protegê-lo contra o estresse oxidativo, catalisando a metilação de compostos fenólicos, que caso não modificados, poderiam virar radicais livres.

Kinnings et al. (2009) estudando novos fármacos para o fungo *Micobacterium tuberculosis* observou que inibidores da COMT humana também agem na enzima 2-trans-enoil-ACP(CoA) redutase responsável pela biossíntese da parede celular deste fungo.

As funções da COMT no fungo *Paracoccidioides* ainda são desconhecidas. Assim, como essa enzima parece desempenhar papéis importantes na sobrevivência de outros fungos e como não há estrutura determinada da COMT nem em *Paracoccidioides* nem em outras espécies fúngicas, ela foi escolhida para esse trabalho.

4. METODOLOGIA

4.1. Clonagem da sequência codificadora da COMT

Para o desenho da sequência codificadora da proteína COMT que seria sintetizada quimicamente e posteriormente clonada, foi analisada a similaridade dessa sequência nas três espécies Pb03, Pb18 e Pb01. Isso é importante porque as diferentes espécies de *Paracoccidioides* causadoras da PCM podem responder de forma diferente ao tratamento ou a um ensaio diagnóstico, caso essa proteína mostre-se, no futuro, promissora para testes de diagnóstico ou como alvos de medicamentos.

A sequência codificadora da enzima COMT foi enviada para a empresa GenScript (Piscataway, EUA) que realizou duas ações: 1- sintetizou quimicamente a sequência nucleotídica de acordo com a sequência enviada e clonou no vetor de clonagem pUC57 e 2- subclonou as sequências no vetor de expressão pET28a(TEV) previamente enviado para a empresa.

O vetor pET28a(TEV) é um vetor pET28a (Novagen, Darmstadt, Alemanha) modificado pela inserção de um sítio de clivagem para a protease TEV (*Tobacco etch virus*) que retira a cauda de histidinas N-terminal adicionada pelo vetor (CARNEIRO et al., 2006) (**Figura 12**).

A proteína COMT que foi clonada possui uma sequência de 292 aminoácidos (**Quadro 1**), massa molecular de 31,9 kDa, um índice de cristalização combinado 2 (de acordo com o servidor XtalPred) e um ensaio enzimático simples.

4.2. Expressão heteróloga

Para a expressão da proteína de interesse, os plasmídeos recombinantes (pET28a(TEV) contendo o gene codificante da COMT – *comt*) foram inseridos em bactérias eletrocompetentes por eletroporação. Diferentes cepas de *E. coli* foram utilizadas para expressão da proteína recombinante, sendo elas: BL21(DE3), ArcticExpress(DE3) (Agilent, Santa Clara, USA), RosettaTM (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) e Rosetta-gamiTM (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Cada uma das cepas possui particularidades que possibilitam diferentes condições de expressão.

Para a eletroporação, 50 µL de cultura de bactérias eletrocompetentes e 1 µL (35 ng.µL⁻¹) da solução de plasmídeo recombinante (pET28a(TEV)-*comt*) foram adicionados a uma cubeta apropriada e eletroporados a 1,8 V. Logo em seguida, foram adicionados 500 µL de meio LB líquido (10 g.L⁻¹ de peptona, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g.L⁻¹ de NaCl, pH 7,4) e a mistura foi deixada sob agitação por 1 h a 37 °C e 280 rpm para expressão do gene de resistência. Posteriormente, a mistura foi plaqueada em meio seletivo 1,5 % (p.v⁻¹) de LB/água com 50 µg.mL⁻¹ de canamicina (e outro antibiótico dependendo de qual cepa de *E. coli* estava sendo utilizada) e deixada na estufa a 37 °C por 16 h. Para ArcticExpress foi necessária a adição de 40 µg.mL⁻¹ de gentamicina e para Rosetta e Rosetta-gami a adição de 34 µg.mL⁻¹ de cloranfenicol.

4.2.1. Expressão heteróloga em *Escherichia coli* BL21(DE3)

Bactérias *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o vetor de expressão pET28a(TEV) contendo o gene *comt* clonado foram inoculadas em 20 mL de meio LB suplementado com o antibiótico canamicina (concentração final 50 µg.mL⁻¹). Após incubação por 18 h a 37 °C e 250 rpm, essa cultura foi transferida para 500 mL de meio LB/canamicina e, após alcançar a OD600 entre 0,5–0,6, foi adicionado isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 0,5 mmol.L⁻¹ para indução da expressão por mais 4 h a 37 °C e 250 rpm.

Alternativamente, o tempo (4 a 18 h) e a temperatura de indução (18 a 37 °C) da expressão foram variados além da concentração de IPTG (0,01 a 1 mM).

4.2.2. Expressão heteróloga em *Escherichia coli* Rosetta(DE3) e *Escherichia coli* Rosetta-gami(DE3)

Bactérias Rosetta ou Rosetta Gami foram transformadas com o vetor de expressão pET28a(TEV) contendo o gene *comt* clonado foram inoculadas em 10 mL de meio LB suplementado com os antibióticos canamicina (concentração final 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e cloranfenicol (concentração final 34 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Após incubação por 18 h a 37 °C e 200 rpm, essa cultura foi transferida para 1 L de meio LB/canamicina e cloranfenicol que foi incubado a 37 °C e 200 rpm até que atingisse a OD600 entre 0,5 e 0,6. Após esse período, foi adicionado IPTG na concentração final de 0,5 mmol.L^{-1} para indução da expressão por mais 4 h a 37 °C e 200 rpm.

Alternativamente, o tempo e a temperatura de indução da expressão foram variados além da concentração de IPTG.

Os primeiros testes de expressão heteróloga utilizando as cepas de *E. coli* Rosetta(DE3) e Rosetta-gami(DE3) foram realizados no Laboratório de Biologia Estrutural (BIOEST) coordenado pelo Prof. Dr. Ronaldo Nagem, na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.2.3. Expressão heteróloga em *Escherichia coli* ArcticExpress(DE3)

Bactérias *E. coli* ArcticExpress(DE3) transformadas com o vetor de expressão pET28a(TEV) contendo o gene *comt* clonado foram inoculadas em 20 mL de meio LB suplementado com o antibiótico canamicina (concentração final 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e gentamicina (concentração final 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Após incubação por 18 h a 37 °C e 250 rpm, essa cultura foi transferida para 500 mL de meio LB (sem antibiótico). Após incubação por 3 h a 30 °C e 250 rpm e depois por mais 10 min a 12 °C e 250 rpm, foi adicionado IPTG na concentração final de 0,5 mmol.L^{-1} para indução da expressão por mais 24 h a 12 °C e 250 rpm.

Alternativamente, o tempo e a temperatura de indução da expressão foram variados além da concentração de IPTG.

4.2.4. Expressão com adição de etanol

Para a expressão com adição de etanol, foi realizado um pré-inóculo padrão (seja para a BL21(DE3), Rosetta, Rosetta-gami ou Arctic Express) contendo 20 μL do clone específico, 5 mL de meio LB e os antibióticos específicos para cada cepa. Esse pré-inóculo foi incubado por 18 h a 37 °C e 250 rpm.

Para o teste inicial de expressão, 20 μL do pré-inóculo foram adicionados a 5 mL de meio LB e, a cada inóculo teste, foi adicionado etanol para as concentrações finais de 1, 2 e 3 %, sendo que um inóculo não recebeu etanol para funcionar como o controle. Assim, esses inóculos foram então submetidos ao protocolo específico de cada cepa.

4.3. Lise bacteriana

As células bacterianas foram coletadas por centrifugação a 4612 g por 10 min para BL21, Rosetta e Rosetta-gami e por 15 min para ArcticExpress. Os pellets foram ressuspendidos em uma proporção de 5 μL de tampão de lise (100 mmol.L^{-1} de Tris-base pH 8,5; 500 mmol.L^{-1} de NaCl; 25 mmol.L^{-1} de sacarose; 10 mmol.L^{-1} de MgCl_2 ; 10 % (v.v⁻¹) de glicerol; 1 % (v.v⁻¹) de Tween 20; 5 mmol.L^{-1} de β -mercaptoetanol; 2 mmol.L^{-1} de PMSF) por cada 1 mg de pellet. As células foram lisadas por 3 ciclos de congelamento (-80 °C) e descongelamento (temperatura ambiente) e em seguida por 3 ciclos de sonicação de 30 s em banho de gelo com intervalos de 30 s. Os debris celulares foram removidos por centrifugação a 4 °C durante 30 min a 15500 g . Alternativamente, alterações no processo de lise foram realizadas.

O acompanhamento da expressão e a verificação da presença da proteína na fase solúvel ou insolúvel após a lise foram realizados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 %.

4.4. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise eletroforética de proteínas foi realizada em géis de poliacrilamida com SDS, como descrita por Laemmli (1970), no sistema Mini-Protean Tetra Cell da BioRad (Hercules, USA). As proteínas foram aquecidas a 100 °C por 5 min em tampão de amostra (0,2 % (p.v⁻¹) de SDS, 50 % (v.v⁻¹) de glicerol e 0,01 % (p.v⁻¹) de

azul de bromofenol em $0,31 \text{ mmol.L}^{-1}$ de Tris-HCl pH 6,8) e separadas em gel contendo 12 % (p.v⁻¹) de poliacrilamida, 0,3 % (p.v⁻¹) de bis-acrilamida e 0,1 % (p.v⁻¹) de SDS, em $0,375 \text{ mmol.L}^{-1}$ de Tris-HCl pH 8,8. O gel de empilhamento foi constituído de 3 % (p.v⁻¹) de poliacrilamida, 0,3 % (p.v⁻¹) de bis-acrilamida e 0,1 % (p.v⁻¹) de SDS em $0,125 \text{ mmol.L}^{-1}$ de Tris-HCl pH 6,8. Os géis de separação e empilhamento foram polimerizados na presença de 0,1 % (p.v⁻¹) de persulfato de amônio e (1:2000, v.v⁻¹) de TEMED. A corrida foi realizada em tampão constituído de $0,192 \text{ mmol.L}^{-1}$ de glicina, 0,1 % (p.v⁻¹) de SDS e $0,025 \text{ mmol.L}^{-1}$ de Tris-base pH 8,5 em uma voltagem constante de 100 V.

Para visualizar as bandas de proteínas, o gel foi incubado por pelo menos duas horas em solução de 15 % (v.v⁻¹) de metanol, 7 % (v.v⁻¹) de ácido acético e 0,25 % (p.v⁻¹) “Coomassie Brilliant Blue” R250. A seguir a solução de 50 % (v.v⁻¹) de metanol e 10 % (v.v⁻¹) de ácido acético foi utilizada para a remoção do excesso de corante. Os géis foram então fotografados.

Foram utilizados dois tipos de marcadores: o marcador de peso molecular “*Precision Plus Protein Unstained Standard*” (BioRad) que contém 10 proteínas recombinantes (variando de 10 a 250 kDa), incluindo três bandas de referência (25, 50 e 75 kDa); e um marcador (marcador LBBMP), montado no nosso próprio laboratório, que contém quatro proteínas com massas moleculares de 67 (Albumina), 43 (Ovoalbumina), 25 (Anidrase carbônica) e 13,7 (Ribonuclease A) kDa.

4.5. Western Blot

O *Western Blot* foi realizado colocando o gel de SDS-PAGE sobre uma membrana de PVDF, ambos embebidos em tampão 48 mmol.L^{-1} de Tris pH 9,2, 39 mmol.L^{-1} de glicina e 20 % metanol. O sistema foi colocado em uma cuba específica para transferência semi-dry sendo submetido à uma voltagem constante de 25 V durante 40 min. O marcador utilizado foi o *Pierce™ Prestained Protein MW Marker* (ThermoFisher Scientific), com 6 proteínas abrangendo de 20 a 120 kDa.

Após ser retirada do sistema, a membrana foi bloqueada por 30 min com leite desnatado 10 % em tampão TBS-T (20 mmol.L^{-1} de Tris-base pH 7,6, 500 mmol.L^{-1}

de NaCl e 0,1 % Tween). Após três lavagens em tampão TBS-T, a membrana foi incubada *overnight* sob agitação a 4 °C com o anticorpo primário específico anti-histidina (Sigma, St. Louis, USA) diluído 1:3000 em tampão TBS-T-leite desnatado 5 %. Após cinco lavagens com TBS-T, o anticorpo secundário anti-imunoglobulina conjugado com peroxidase (Anti-mouse IgG – whole molecule –peroxidase conjugate, Sigma, St. Louis, USA) na diluição de 1:5000 em TBS-T-leite desnatado 5 % foi adicionado e incubado por 1h sob agitação à temperatura ambiente.

A membrana foi revelada por quimioluminescência (técnica ECL – “*Enhanced Chemoluminescence*”) e a marcação visualizada no equipamento Chemidoc (BioRad).

Os ensaios de *Western blot* foram realizados no Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental (LNMC) da UFES, coordenado pelas professoras Dra. Cristina Martins e Silva e Dra. Rita Gomes Wanderley Pires.

4.6. Purificação da proteína recombinante

Para purificar a proteína de interesse foram realizadas duas etapas de purificação. A primeira purificação foi realizada utilizando cromatografia por afinidade e a segunda utilizando cromatografia por gel filtração.

4.6.1. Cromatografia por afinidade

A cromatografia por afinidade foi realizada utilizando uma coluna montada com uma resina de Ni²⁺ HisTrap HP (GE Healthcare Biosciences) de 7 mL pré-equilibrada com 5 volumes de tampão de equilíbrio (100 mmol.L⁻¹ de Tris pH 8,0; 500 mmol.L⁻¹ de NaCl; 30 mmol.L⁻¹ de imidazol). O sobrenadante (fase solúvel), obtido após lise e remoção dos debris e adicionado de 30 mmol.L⁻¹ de imidazol (concentração final), foi aplicado na coluna. Após passagem da amostra, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de equilíbrio e a proteína recombinante foi eluída pela passagem do tampão de eluição (100 mmol.L⁻¹ de Tris pH 8,0; 500 mmol.L⁻¹ de NaCl e diferentes concentrações de imidazol).

Foram, portanto, avaliadas uma eluição com tampão de eluição com gradiente crescente de 50, 100, 200, 400 e 500 mmol.L⁻¹ de imidazol e uma eluição linear com tampão de eluição contendo 500 mmol.L⁻¹ de imidazol.

A purificação por cromatografia de afinidade foi acompanhada por leitura das frações obtidas em espectrofotômetro (comprimento de onda 280 nm) e por SDS-PAGE 12 %.

4.6.1.1. Diálise e concentração da proteína COMT obtida após cromatografia de afinidade

Após a cromatografia de afinidade, a amostra contendo as frações obtidas após a eluição foram submetidas à diálise. Para isso, 40 mL da amostra foram adicionados a um saco de diálise utilizando uma membrana de celulose de *Cut off* de 6 a 8 kDa e colocado em contato 2 L de tampão 100 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl pH 8,0 e 500 mmol.L⁻¹ de NaCl por 18 horas a 4 °C e com leve agitação. Foram realizadas 2 trocas de tampão.

Após a diálise, a amostra foi concentrada utilizando filtro Vivaspin® Turbo 15 da Sartorius (*Cut off* 10 kDa) e centrifugação a 4 °C e 4000 g.

4.6.2. Cromatografia por gel filtração

Foram testadas duas diferentes colunas de gel filtração: Ultrahydrogel® 250 (Waters, Milford, EUA) e Superose 12 10/300 (GE Healthcare Biosciences).

A coluna Ultrahydrogel 250 (volume de 14,3 mL) foi utilizada acoplada ao sistema HPLC (Shimadzu, Quioto, Japão) disponível no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM) na UFES. A coluna foi equilibrada com tampão 100 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl pH 7,5 e 100 mmol.L⁻¹ de NaCl com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ com temperatura do forno e do detector a 30 °C e a pressão máxima de 120 kg.cm⁻². Para a corrida, foram injetados 100 µL de amostra em concentrações variadas.

A coluna foi calibrada utilizando as proteínas (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) de massa molecular conhecida (padrões) albumina (66 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ribonuclease A (13,7 kDa) e citocromo C (12,3 kDa). Para isso, 20 µL de cada proteína a 1 mg.mL⁻¹ foram aplicados na coluna e a corrida seguiu os mesmos parâmetros da corrida da amostra de COMT.

A coluna Superose 12 10/300 (volume de 24 mL) foi utilizada acoplada ao sistema HPLC (Shimadzu, Quioto, Japão) disponível no Laboratório de Química de Proteínas

(LQP) da UFES, coordenado pela professora Dra. Suely Gomes de Figueiredo. A coluna foi pré-equilibrada com tampão 100 mmol.L⁻¹ de Tris-base pH 8,0, 100 mmol.L⁻¹ de NaCl e 10 mmol.L⁻¹ de MgCl₂ a um fluxo de 0,3 mL.min⁻¹. Para calibrar a coluna, foram utilizados 1 mg de albumina (66 kDa) e citocromo C (12,3 kDa) diluídos em 20 µL de tampão.

Durante a corrida, foram aplicados 500 µL da amostra dialisada e concentrada a 2 mg.mL⁻¹ utilizando os mesmos parâmetros da corrida para as proteínas padrão.

Após a cromatografia de gel filtração, a amostra obtida foi concentrada utilizando filtro Vivaspín® Turbo 15 da Sartorius (*Cut off* 10 kDa) a 4 °C e 4000 g.

4.7. Caracterização bioquímica e biofísica

4.7.1. Ensaio enzimático (espectrofotometria UV/UV-Vis)

A atividade da enzima COMT foi determinada espectrofotometricamente seguindo o consumo do substrato catecol de acordo com o método descrito por Dhar e Rosazza (2000), baseado no método de Arnow (1937). Adaptações ao método foram realizadas para trabalhar com volumes menores de amostra.

A reação enzimática padrão continha 1 mmol.L⁻¹ de DTT, 10 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, 2 mmol.L⁻¹ de SAM, 1 mmol.L⁻¹ de catecol e 20 a 200 mg da enzima COMT e tampão 50 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl pH 7,5, para um volume final de 200 µL. As reações enzimáticas foram incubadas a 35 °C por 30 min e encerradas pela adição sucessiva de 200 µL de 0,5 mmol L⁻¹ de HCl, 200 µL de 10 % (p.v⁻¹) de NaNO₂, 200 µL de 10 % (p.v⁻¹) de NaMoO₄, e 200 µL de 1 mmol L⁻¹ de NaOH. Esses reagentes de parada formam um complexo de cor vermelho-alaranjada ($\epsilon = 1,1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) que absorve luz no comprimento de onda de 510 nm (ARNOW, 1937)

Ao término da reação, foram adicionados 500 µL de água MiliQ para ajustar a leitura para a faixa linear de absorbância (entre 0,1 e 1). A absorbância a 510 nm do branco (reação sem adição da enzima) e da reação enzimática foi medida imediatamente para determinar a quantidade de catecol consumida na reação.

Unidades de atividade da COMT foram definidas como a quantidade de enzima necessária para catalisar a metilação de 1 µmol de catecol por minuto nas condições

padrões de ensaio. Atividades específicas foram expressas como unidade por miligrama de proteína.

A quantidade de proteína foi medida utilizando a absorbância da luz a 280 nm e coeficiente de extinção molar (ϵ) foi previsto *in silico* no ProtParam (web.expasy.org/protparam/) como sendo $26820 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ com todos os resíduos de cisteína reduzidos.

4.7.2 Desnaturação térmica

Para monitorar a desnaturação térmica, o método de variação de absorção entre estados nativos e desnaturados foi aplicado monitorando dois comprimentos de onda (280 e 293 nm). A amostra utilizada foi 1 mL a $0,17 \text{ mg.mL}^{-1}$ da fração 2 obtida após a cromatografia por gel filtração com Superose 12.

Um espectrofotômetro UV-Vis Evolution [™] 300 (Thermo Fisher Scientific, Inc, EUA) equipado com um controlador de temperatura de amostra termoelétrica (sistema Peltier) foi usado para registrar as medidas de absorção. O intervalo de temperatura foi de 288.15K até 353.15K com 5 K.min^{-1} e intervalo de aquisição de 30s. As medidas foram realizadas com soluções a $0,17 \text{ mg.mL}^{-1}$ da fração 2 de COMT (obtida em gel filtração) em 100 mmol.L^{-1} de tampão de Tris a pH 8,0 com 100 mmol.L^{-1} de NaCl e 10 mmol.L^{-1} de MgCl_2 .

4.8. Dicroísmo circular

Uma amostra de 100 μL da fração 2 obtida após a cromatografia por gel filtração na concentração de $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$ foi adicionada em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm para obtenção dos dados utilizando um espectropolarímetro, Jasco J-810 equipado com sistema Peltier de controle de temperatura. Foram adquiridos espectros do UV distante de 190-260 nm. Para cada espectro da amostra foi subtraído o espectro do tampão correspondente. Um espectro representa a média de 10 acumulações, com resolução 0,5 nm, tempo de resposta de 4 segundos e velocidade de varredura de 50 nm.min^{-1} (VIANA et al., 2010). Estes experimentos foram realizados no Laboratório de espectroscopia e calorimetria (LEC) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO) em Campinas.

Os resultados foram analisados através do programa CDNN para gerar a porcentagem de cada estrutura secundária.

4.9. Análise estrutural *in silico*

4.9.1. Alinhamento local

O alinhamento local foi realizado utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

4.9.2. Predição estrutura secundária

A predição da estrutura secundária foi realizada utilizando as ferramentas online gratuitas PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), PHYRE2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) e PORTER (<http://distillf.ucd.ie/porter/>).

4.9.3. Modelagem da proteína

O modelo tridimensional da proteína foi gerado utilizando o I-TASSER, disponível em <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Expressão heteróloga

5.1.1. Expressão heteróloga em *Escherichia coli* BL21(DE3)

A bactéria *E. coli* BL21(DE3) atualmente é a cepa mais utilizada para expressão heteróloga. Ela possui benefícios como alta quantidade de expressão em baixo tempo de indução, devido a ausência das proteases Lon e OmpT (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Porém, a desvantagem é que a alta quantidade de expressão pode produzir corpos de inclusão com proteínas agregadas na fração insolúvel da lise bacteriana (LEBENDIKER; DANIELI, 2013).

Após um teste padrão para expressão heteróloga da COMT em *E. coli* BL21(DE3) utilizando indução com 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG por 4 h a 37 °C onde a COMT foi expressa em boa quantidade, porém, totalmente no extrato insolúvel, foram realizadas diferentes abordagens na tentativa de obter essa proteína solúvel.

Assim, diferentes parâmetros foram variados:

- i) Temperatura. Mudanças na temperatura podem influenciar na taxa de alongamento da cadeia polipeptídica, induzindo consequentemente o colapso da cadeia polipeptídica em domínios estruturais ordenados. A diminuição da temperatura permite que as chaperonas bacterianas e os aditivos químicos protejam a cadeia polipeptídica crescente e auxiliem no enovelamento correto (LEBENDIKER; DANIELI, 2013);
- ii) Tempo de indução, que pode levar a maior ou menor produção da proteína recombinante;
- iii) Concentração do indutor (IPTG). A concentração de indutor afeta a produção de mRNA e influencia a concentração local de cadeias polipeptídicas nascentes. As concentrações reduzidas do indutor podem impedir a agregação das cadeias em crescimento enquanto ainda estão no polissoma (LEBENDIKER; DANIELI, 2013);
- iv) Meio de cultura. O meio padrão de expressão utilizado foi o meio LB, mas foram testadas concentrações variadas de NaCl, para fornecer força iônica

para o enovelamento da proteína e de MgCl_2 , cofator da proteína que também auxiliaria no enovelamento da mesma;

- v) Condições de lise. O tempo de sonicação, da temperatura de congelamento/descongelamento, da lise por cisalhamento e lise por agitação em tampão de lise podem influenciar na solubilidade da proteína recombinante.

De forma geral, todas as abordagens avaliadas resultaram na produção da COMT na fração insolúvel da lise bacteriana. A **Figura 13** apresenta resultados de expressões heterólogas realizadas a 37 °C (por 4 h) e 18 °C (por 18 h), ambas com 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG, e das frações solúveis e insolúveis das lises dessas expressões.

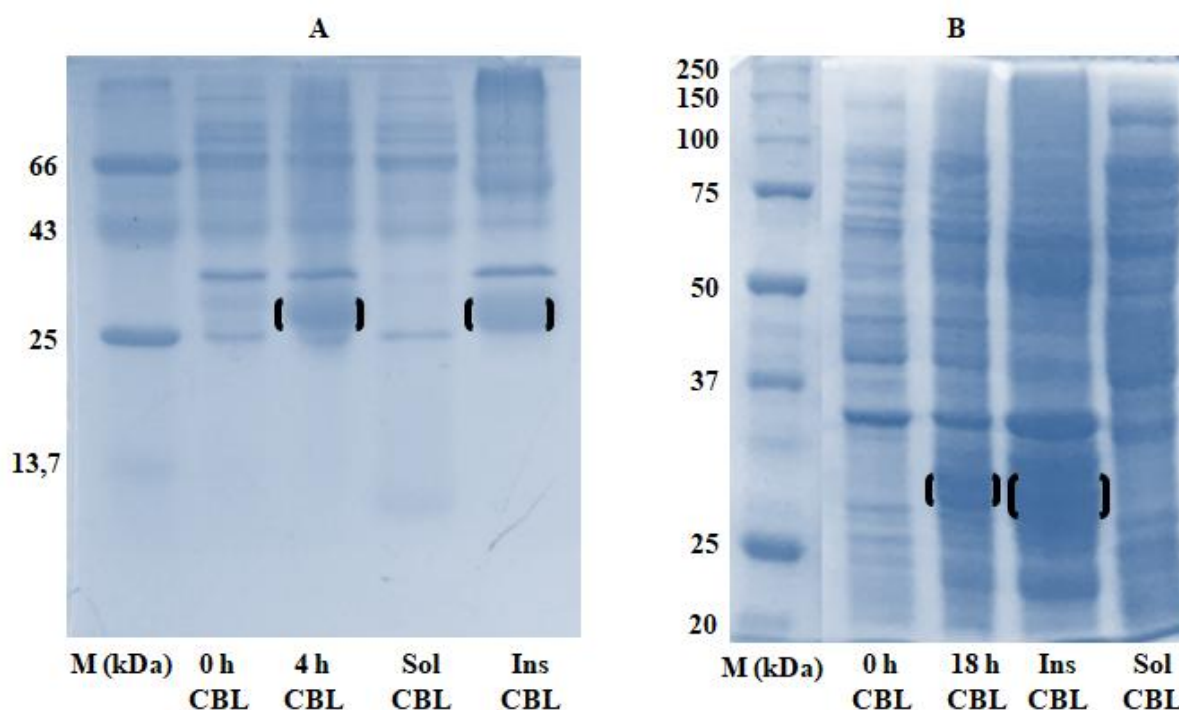


Figura 13. SDS-PAGE 12 % da expressão heteróloga e lise de COMT em *E. coli* BL21. Resultado da expressão heteróloga e também da lise de COMT em *E. coli* BL21. Nas condições de expressão a 37 °C (A) e 18 °C (B) (0,5 mmol L⁻¹ de IPTG) a proteína se apresentou na fração insolúvel da lise bacteriana quando analisada em SDS-PAGE 12%. A) Expressão heteróloga de COMT em BL21 a 37 °C por 4 h. B) Expressão heteróloga de COMT em BL21 a 18 °C por 18 h. Para o gel A) M = marcador LBBMP; Para o gel B) M = *Precision Plus Protein Unstained Standard* (BioRad); 0 h CBL = pellet de COMT BL21 com 0 h de indução; 4 h CBL = pellet de COMT BL21 com 4 h de indução; 18 h CBL = pellet de COMT BL21 com 18 h de indução; Sol CBL = fração solúvel da lise bacteriana de COMT BL21; Ins CBL = fração insolúvel da lise bacteriana de COMT BL21; Banda entre parênteses () = COMT + sítio TEV + His-tag com 33,9 kDa.

Como descrito anteriormente, por ser a cepa bacteriana mais utilizada atualmente para expressão heteróloga, a *E. coli* BL21 foi a primeira a ser testada. Após todos os testes apresentarem resultados insatisfatórios, expressão da proteína na fração insolúvel, outras cepas de *E. coli* foram testadas para obtenção da proteína recombinante na fração solúvel da lise bacteriana.

5.1.2. Expressão heteróloga em *Escherichia coli* Rosetta(DE3)

A bactéria *E. coli* Rosetta(DE3) é utilizada para expressar proteínas as quais possuem códons raros. Outras cepas de bactérias *E. coli* não possuem certos tRNAs em grandes quantidades no citosol. A Rosetta, por sua vez, contém o plasmídeo pRARE com genes extras para os tRNAs dos códons AGG/AGA (Arg), AUA (Ile), CCC (Pro) e GGA (Gly). Esse fato pode influenciar na síntese da proteína e no seu enovelamento, o que pode afetar a solubilidade da mesma (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Os primeiros testes para expressão heteróloga da COMT em *E. coli* Rosetta foram realizados no Laboratório de Biologia Estrutural (BIOEST) coordenado pelo Prof. Dr. Ronaldo Nagem, na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). No BIOEST, a cepa foi submetida a condições de expressão por 4 h a 37 °C e a 18 h por 18 °C (0,5 mmol L⁻¹ de IPTG). Os resultados das expressões são apresentados na **Figura 14**.

A proteína de interesse foi expressa na fração solúvel da lise bacteriana, quando realizada expressão por 18 h a 18 °C e 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG.

O fato da proteína de interesse necessitar desses códons raros e ser expressa em bactérias com o plasmídeo pRARE pode influenciar de maneira negativa ou positiva em sua solubilidade. O aumento da produção da proteína devido a presença dos tRNAs adicionais, pode causar um aumento de expressão e, em alguns casos, diminuir a solubilidade da proteína. Isso acontece porque a pausa na velocidade de tradução (organismos sem pRARE) pode ser um fator que desacelera a formação de novas cadeias polipeptídicas, prevenindo a formação de agregados (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

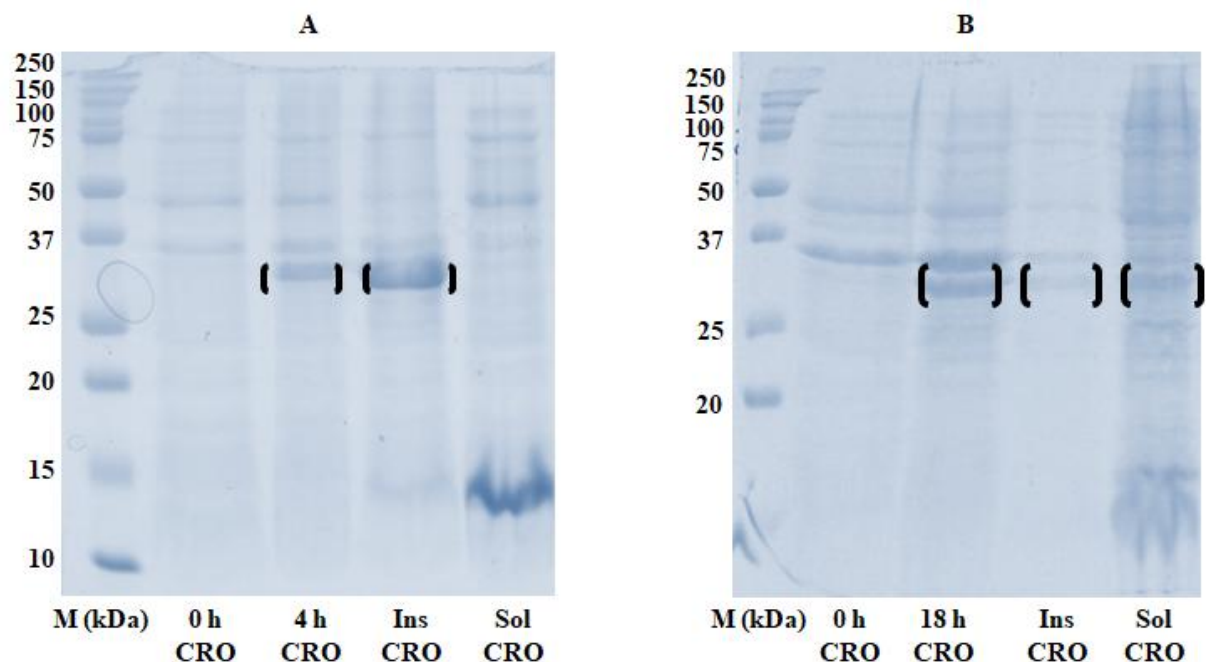


Figura 14. SDS-PAGE 12 % da expressão heteróloga e lise de COMT em *E. coli* Rosetta. Resultado da expressão heteróloga e também da lise de COMT em *E. coli* Rosetta. Todas as induções foram realizadas com 0,5 mmol.L⁻¹ de IPTG. Quando expressa a 37 °C (A) a proteína se apresentou na fração insolúvel da lise bacteriana. Porém quando expressa a 18 °C (B) a proteína se apresentou em ambas frações insolúvel e solúvel da lise bacteriana quando analisada em SDS-PAGE 12%. A) Expressão heteróloga de COMT em Rosetta a 37 °C por 4 h. B) Expressão heteróloga de COMT em Rosetta a 18 °C por 18 h. M = *Precision Plus Protein Unstained Standard*™ (BioRad); 0 h CRO = pellet de COMT Rosetta com 0 h de indução; 4 h CRO = pellet de COMT Rosetta com 4 h de indução; 18 h CRO = pellet de COMT Rosetta com 18 h de indução; Sol CRO = fração solúvel da lise bacteriana de COMT Rosetta; Ins CRO = fração insolúvel da lise bacteriana de COMT Rosetta; Banda entre parênteses () = COMT + sítio TEV + His-tag com 33,9 kDa.

Para a COMT de *Paracoccidioides*, são encontrados 3 AGG, 5 AGA, 11 GGA, 7 AUA e 2 CCC. Ao total são 28 códons suplementados pelos tRNAs extras fornecidos pelo plasmídeo pRARE, um total de aproximadamente 9,6 % da proteína. Essa porcentagem sugere que ocorre um aumento na taxa de alongamento das cadeias polipeptídicas. Em altas temperaturas e com os tRNAs extras, a taxa de alongamento das cadeias polipeptídicas nascentes pode ter aumentado e resultado em uma maior formação de agregados (fração insolúvel da **Figura 14A**). Porém, com a diminuição da temperatura a taxa de formação dessas cadeias polipeptídicas parece ter diminuído e os tRNAs terem sido úteis (quando comparados com a BL21 a 18 °C) na produção da COMT na fração solúvel da lise bacteriana (**Figura 14B**).

Ao tentar repetir em nosso laboratório (LBBMP) os mesmos resultados obtidos no BIOEST, a proteína foi expressa na fração insolúvel da lise bacteriana.

Acredita-se que a principal diferença observada entre as duas condições (expressão a 18 °C no BIOEST e expressão a 18 °C no LBBMP) foi a de lise. A lise da parede bacteriana através de sonicação foi diretamente afetada devido aos diferentes equipamentos utilizados. Por ser menos potente, o sonicador do LBBMP pode não ter produzido energia suficiente para correta lise e solubilização da COMT.

Para que essa cepa de bacteriana seja utilizada na produção da COMT no LBBMP novos protocolos de lise deverão ser testados.

5.1.3. Expressão heteróloga em *Escherichia coli* Rosetta-gami(DE3)

A bactéria *E. coli* Rosetta-gami(DE3) possui o mesmo plasmídeo pRARE, e consequentemente, as mesmas funções da Rosetta. Porém, a Rosetta-gami também possibilita a formação de pontes dissulfeto durante a expressão da proteína na bactéria (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Isso é possível devido à mutação em dois sistemas da *E. coli* responsáveis pelo ambiente redutor em seu citoplasma. Os sistemas tiorredoxina-tioredoxina redutase, e glutaredoxina-glutaredoxina redutase mutados em Rosetta-gami favorecem a formação de pontes dissulfeto no citosol da bactéria (BESSETTE, et al., 1999).

Os primeiros testes para expressão heteróloga da COMT em *E. coli* Rosetta-gami também foram realizados no Laboratório de Biologia Estrutural (BIOEST). No BIOEST, a cepa foi submetida a condições de expressão por 4 h a 37 °C e a 18 h por 18 °C (0,5 mmol L⁻¹ de IPTG). Os resultados das expressões são apresentados na **Figura 15**.

O mesmo resultado obtido para cepa Rosetta foi obtido na Rosetta-gami. A proteína de interesse foi expressa na fração solúvel da lise bacteriana, quando realizada expressão por 18 h a 18 °C e 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG.

A COMT de *Paracoccidioides* possui 4 resíduos de cisteínas e, de acordo com os resultados obtidos para a expressão heteróloga em Rosetta-gami, eles não formam pontes dissulfeto essenciais para o enovelamento da proteína. Caso as pontes dissulfeto fossem essenciais, uma diferença na expressão entre Rosetta e Rosetta-gami seria observada.

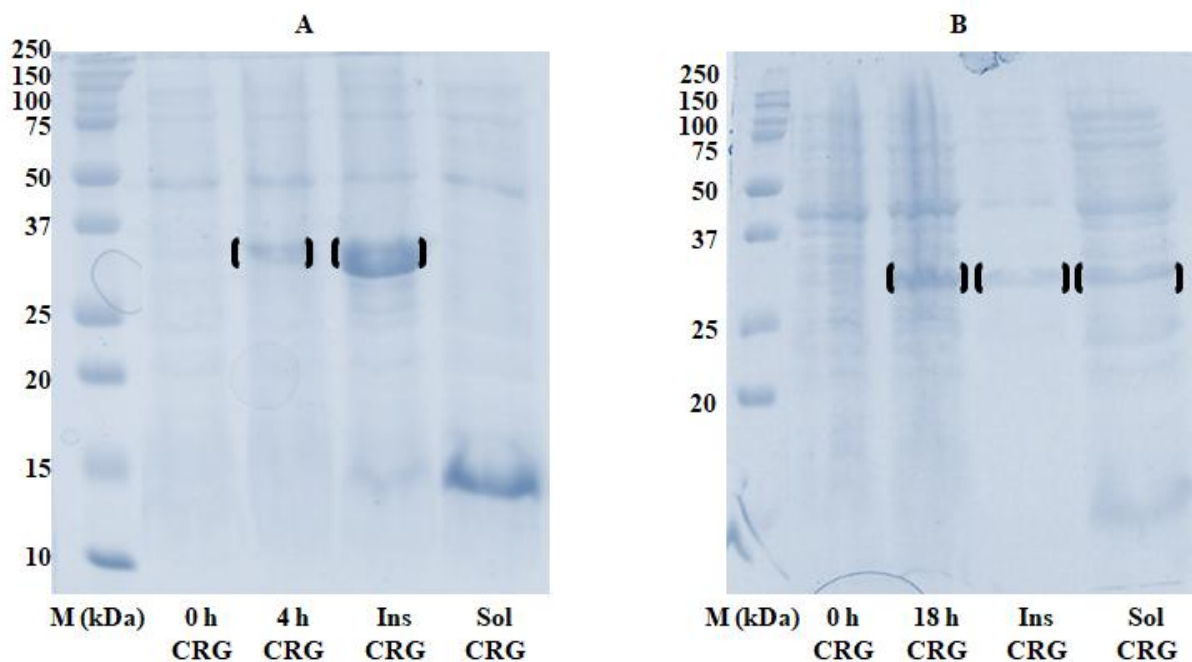


Figura 15. SDS-PAGE 12 % da expressão heteróloga e lise de COMT em *E. coli* Rosetta-gami. Resultado da expressão heteróloga e também da lise de COMT em *E. coli* Rosetta-gami. Quando expressa a 37 °C (A) a proteína se apresentou na fração insolúvel da lise bacteriana. Porém quando expressa a 18 °C (B) a proteína se apresentou em ambas frações insolúvel e solúvel da lise bacteriana quando analisada em SDS-PAGE 12 %. A) Expressão heteróloga de COMT em Rosetta-gami a 37 °C por 4 h. B) Expressão heteróloga de COMT em Rosetta-gami a 18 °C por 18 h. M = *Precision Plus Protein Unstained Standard* (BioRad); 0 h CRG = pellet de COMT Rosetta-gami com 0 h de indução; 4 h CRG = pellet de COMT Rosetta-gami com 4 h de indução; 18 h CRG = pellet de COMT Rosetta-gami com 18 h de indução; Sol CRG = fração solúvel da lise bacteriana de COMT Rosetta-gami; Ins CRG = fração insolúvel da lise bacteriana de COMT Rosetta-gami; Banda entre parênteses () = COMT + sítio TEV + HISTAG com 33,9 kDa.

Novamente, ao tentar repetir em nosso laboratório (LBBMP) os mesmos resultados obtidos no BIOEST, a proteína foi expressa na fração insolúvel da lise bacteriana. Acredita-se que o problema seja o mesmo descrito para expressão e lise da COMT em *E. coli* Rosetta.

Para que essa cepa de bacteriana seja utilizada na produção da COMT no LBBMP novos protocolos deverão ser testados.

5.1.4. Expressão heteróloga em *Escherichia coli* ArcticExpress(DE3)

Como alternativa para melhorar a solubilidade da proteína COMT, a bactéria *E. coli* Arctic Express(DE3) foi utilizada. Essa cepa possui duas chaperoninas, Cpn10 e Cpn60, que são funcionais a baixas temperaturas (4 a 13 °C) (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Como já mencionado, a diminuição da temperatura possibilita uma melhor solubilidade da proteína recombinante a ser expressa. Mas a diminuição da temperatura também diminui a atividade das chaperonas GroEL/GroES de *E. coli*. A cepa ArcticExpress contorna este problema ao possuir essas duas chaperoninas Cpn10 e Cpn60. Desse modo, expressões em temperaturas mais baixas e com melhor solubilidade são possíveis (FERRER et al., 2003; FERRER et al., 2004).

Para a expressão heteróloga da COMT em *E. coli* Arctic Express(DE3) também foram avaliadas diferentes temperaturas e tempos de indução; concentração de indutor; meio de cultura; condições de lise; além da presença ou não de antibiótico no inóculo. A maioria dos resultados foram insatisfatórios devido ao fato das expressões em ArcticExpress não produzirem ou produzirem pouca quantidade da proteína de interesse (consequência da diminuição da temperatura).

O tempo de indução sugerido no manual da cepa ArcticExpress é de 24 h a 12 °C. Nesse tempo de indução, a expressão de COMT foi muito baixa (**Figura 16**). Na tentativa de aumentar a produção, o tempo de indução da proteína foi aumentado de 24 para 67 h a 12 °C. O resultado da expressão heteróloga a 12 °C por 67 h é apresentado na **Figura 17**.

A expressão com 0,5 mmol.L⁻¹ de IPTG a 12 °C por 67 h resultou em produção da COMT nas frações insolúvel e solúvel da lise bacteriana, porém, a quantidade de proteína expressa no tempo total e na fração solúvel foi bem maior que aquela obtida quando a indução foi por 24h (**Figura 16**). Ou seja, essa condição foi promissora para a expressão da COMT na fração solúvel. O próximo passo foi testar se as bactérias estavam sobrevivendo por todo este período de indução e se o pH se mantinha estável (**Figura 18**).

O resultado do gráfico apresentado na **Figura 18** demonstra que as bactérias não sofrem uma morte completa ou uma redução significativa com as 67 h de indução. Sendo assim, não ocorreram perdas na produção de proteína devido ao longo tempo de indução.

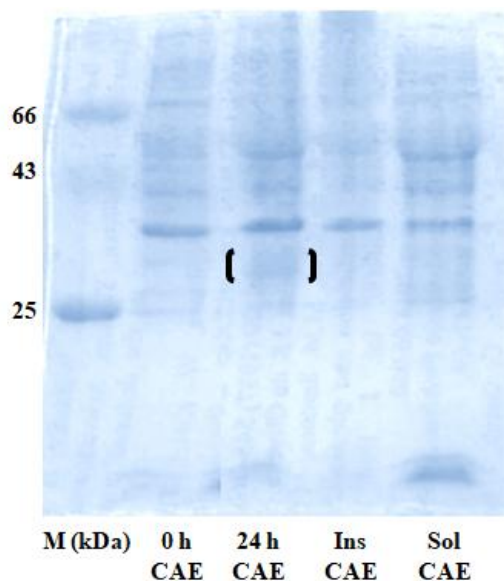


Figura 16. SDS-PAGE 12 % da expressão heteróloga por 24 h e lise de COMT em *E. coli* ArcticExpress. Resultado da expressão heteróloga e também da lise de COMT em *E. coli* ArcticExpress. Concentração de $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de IPTG. Quando expressa a 12°C por 24 h a proteína aparenta ser pouco expressa quando analisada em SDS-PAGE 12%. M = *Precision Plus Protein Unstained Standard* (BioRad); 0 h CAE = pellet de COMT ArcticExpress com 0 h de indução; 24 h CAE = pellet de COMT ArcticExpress com 24 h de indução; Ins CAE = fração insolúvel da lise bacteriana de COMT ArcticExpress; Sol CAE = fração solúvel da lise bacteriana de COMT ArcticExpress; Banda entre parênteses () = COMT + sítio TEV + His-tag com 33,9 kDa.

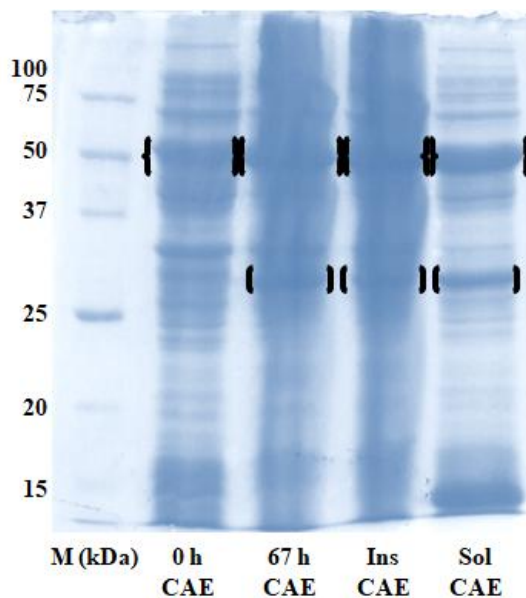


Figura 17. SDS-PAGE 12 % da expressão heteróloga por 67 h e lise de COMT em *E. coli* ArcticExpress. Resultado da expressão heteróloga e também da lise de COMT em *E. coli* ArcticExpress. Concentração de $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de IPTG. Quando expressa a 12°C por 67 h a proteína se apresentou em ambas frações insolúvel e solúvel da lise bacteriana quando analisada em SDS-PAGE 12 %. M = *Precision Plus Protein Unstained Standard* (BioRad); 0 h CAE = pellet de COMT ArcticExpress com 0 h de indução; 67 h CAE = pellet de COMT ArcticExpress com 67 h de indução; Sol CAE = fração solúvel da lise bacteriana de COMT ArcticExpress; Ins CAE = fração insolúvel da lise bacteriana de COMT ArcticExpress; Banda entre parênteses () = COMT + sítio TEV + His-tag com 33,9 kDa; Banda entre { } = suposta chaperonina Cpn60 da ArcticExpress.

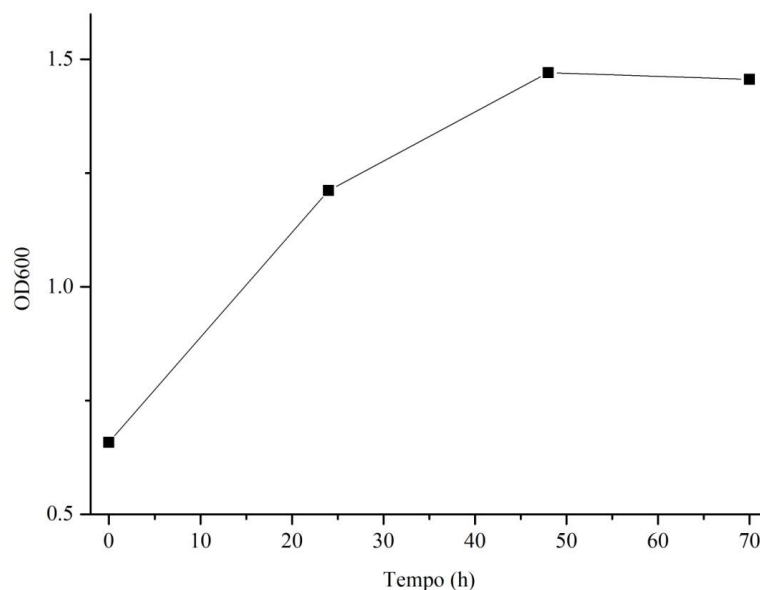


Figura 18. OD600 ao longo do tempo na expressão de COMT em ArcticExpress. A OD600 ao longo do tempo de indução foi monitorada. Mesmo 70 horas de indução não foram suficientes para reduzir a quantidade de bactérias a um nível significativo. Deste modo, a expressão com 67 horas de indução se demonstra uma alternativa favorável à expressão da COMT.

Em relação ao pH, ele foi monitorado utilizando fita indicadora da faixa de pH. O resultado observado foi de que nas primeiras 48 h o pH se manteve na faixa de 6 a 7, e das 48 h até as 70 h o pH se manteve na faixa de 7 a 8. Para esse resultado, não foi considerado que o pH estivesse interferindo na expressão da proteína, tendo em vista que a faixa ideal é em torno de 7.

5.1.5. Expressão com adição de etanol

Na tentativa de diminuir o tempo de indução, também foi avaliada a adição de 2 e 3% (v.v⁻¹) de etanol com indução por 24h. Chhetri e colaboradores (2015) obtiveram aumento da expressão de proteínas recombinantes ao utilizar adições de etanol no meio de cultura. Todas as induções foram realizadas com 0,5 mmol.L⁻¹ de IPTG utilizando a temperatura de 12 °C com agitação a 250 rpm.

Como observado na **Figura 19**, há boa expressão da proteína com apenas 24 h de indução quando 2 ou 3 % de etanol é adicionado ao meio. O próximo passo é fazer a lise e verificar se a proteína, assim como na indução sem etanol por 67 h, aparece no extrato solúvel.

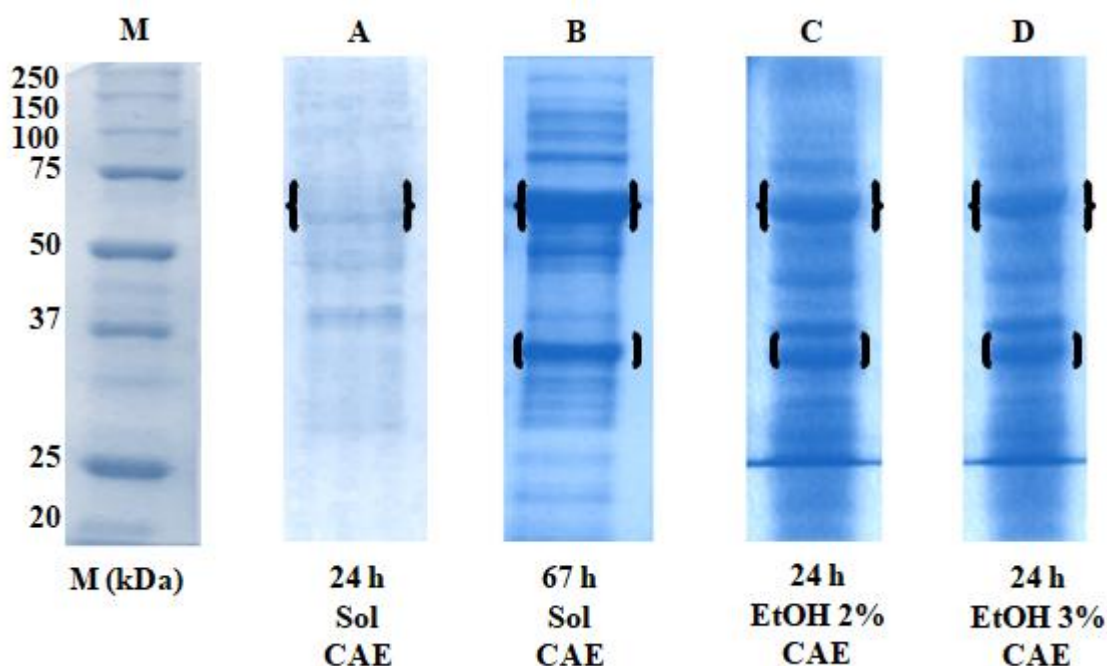


Figura 19. SDS-PAGE 12 % da expressão heteróloga de COMT em *E. coli* ArcticExpress com e sem a presença de etanol. Todas as expressões foram realizadas com $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de IPTG. Para as amostras de 24 h sem etanol (A) e 67 h sem etanol (B) as imagens dos géis representam a fração solúvel da lise bacteriana. Para as amostras de 24 h com 2 % de etanol (C) e 24 h com 3 % de etanol (D) as imagens dos géis representam o pellet da expressão. M = *Precision Plus Protein Unstained Standard* (BioRad); Banda entre parênteses () = COMT + sítio TEV + His-tag com 33,9 kDa; Banda entre { } = suposta chaperonina Cpn60 da ArcticExpress.

Chhetri e colaboradores (2015) acreditam que a presença de etanol poderia mimetizar a resposta de choque térmico em *E. coli*, o que também auxiliaria na estabilidade e o correto enovelamento das proteínas expressas.

Esse aumento da indução resultaria em uma aceleração da produção de COMT, pois ao final das purificações, são obtidas baixas concentrações de COMT (6 mL à 2 mg.mL^{-1} no máximo). O que rende um total de aproximadamente 1,67 mg de proteína por litro de expressão. Essas baixas concentrações são obtidas de 3 expressões heterólogas que no total demoram 3 semanas. Sendo que para a formação de um cristal seriam necessárias grandes quantidades de proteína pura.

5.2. Purificação da proteína recombinante

5.2.1. Cromatografia por afinidade

A fração solúvel obtida da expressão da COMT em *E. coli* Arctic Express(DE3) (indução com $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de IPTG por 67 h a 12°C) foi submetida à cromatografia

por afinidade utilizando a resina Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences). O Ni^{2+} presente na resina possibilita a ligação coordenada do metal com as seis histidinas presentes na porção N-terminal da proteína recombinante. Depois de ligadas, tampões com imidazol, um competidor pelo Ni^{2+} presente na resina, foram utilizados para sua eluição (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

Foram utilizadas duas abordagens para eluição da proteína na cromatografia de afinidade: eluição com tampão 100 mmol.L^{-1} de Tris-HCl pH 8,0, 500 mmol.L^{-1} de NaCl e contendo um gradiente crescente de 50 a 500 mmol.L^{-1} de imidazol (**Figura 20**) e eluição em um único passo com o mesmo tampão contendo 500 mmol.L^{-1} de imidazol (**Figura 21**).

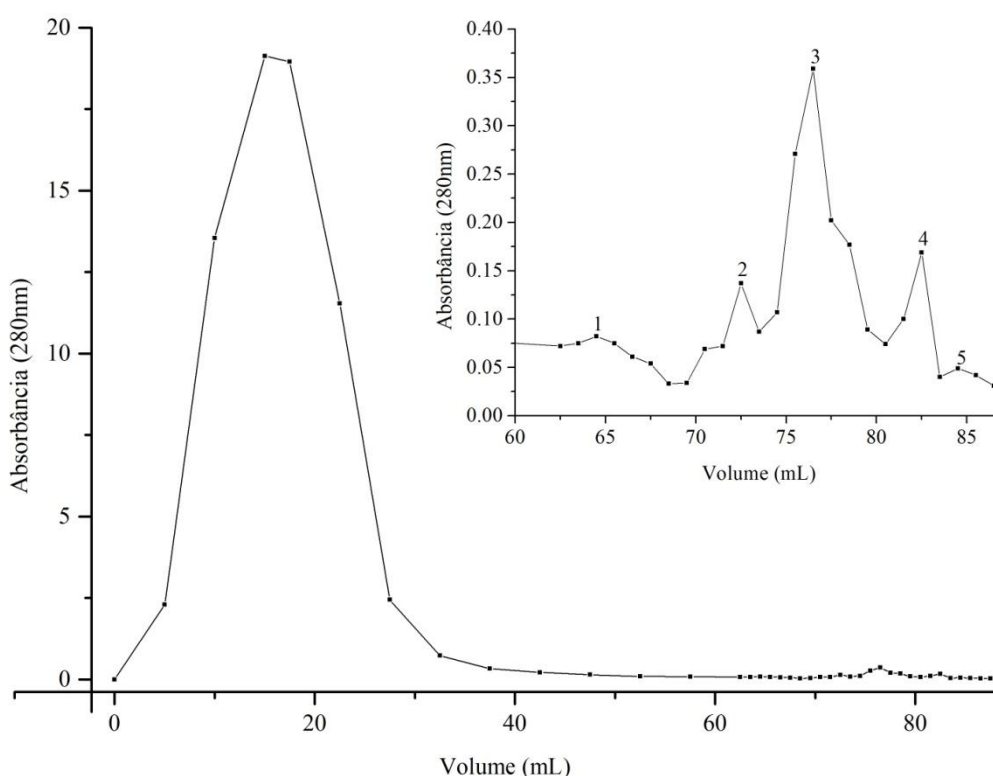


Figura 20. Cromatografia de afinidade por níquel da fração solúvel de COMT expressa em ArcticExpress (Eluição linear com gradiente crescente de imidazol). À fração solúvel da lise bacteriana de ArcticExpres (2 L de expressão) foi adicionado imidazol para concentração final de 30 mmol.L^{-1} . A mistura foi aplicada em uma coluna de cromatografia por afinidade ao níquel. O gráfico apresenta a aplicação da amostra de aproximadamente 0 a 15 mL; a lavagem de 15 a 65 mL; e a eluição de 65 a 90 mL. O inserto no gráfico mostra a ampliação da região de eluição no cromatograma. Cada número representa o pico (maior concentração de proteínas) da eluição proveniente das diferentes concentrações de imidazol. Pico 1 = 50 mmol.L^{-1} de imidazol; Pico 2 = 100 mmol.L^{-1} de imidazol; Pico 3 = 200 mmol.L^{-1} de imidazol; Pico 4 = 400 mmol.L^{-1} de imidazol; Pico 5 = 500 mmol.L^{-1} de imidazol.

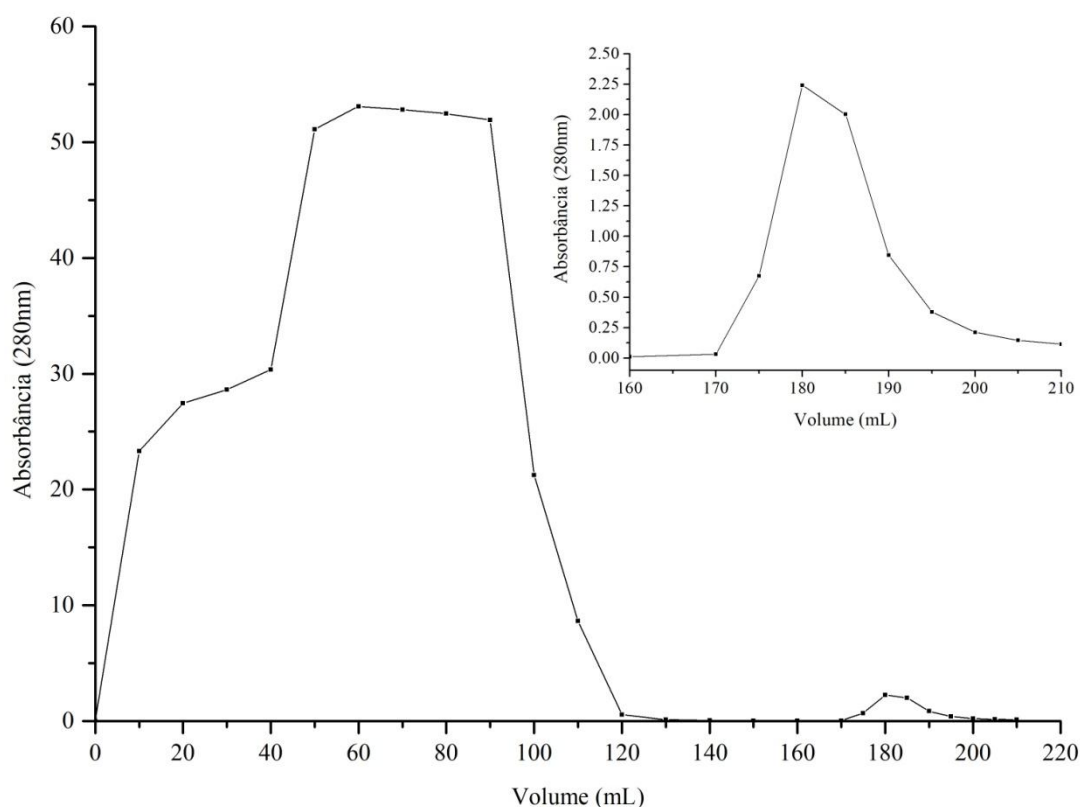


Figura 21. Cromatografia de afinidade por níquel da fração solúvel de COMT expressa em ArcticExpress (Eluição com 500 mmol.L⁻¹ de imidazol). A fração solúvel da lise bacteriana de ArcticExpress (7,2 L de expressão) foi adicionado imidazol para concentração final de 30 mmol.L⁻¹. A mistura foi aplicada em uma coluna de cromatografia por afinidade ao níquel. O gráfico apresenta a aplicação da amostra de aproximadamente 0 a 100 mL; a lavagem de 100 a 170 mL; e a eluição de 170 a 205 mL. O inserto no gráfico mostra a ampliação da região de eluição no cromatograma. A eluição foi realizada com única concentração de 500 mmol.L⁻¹ imidazol.

As **Figuras 20 e 21** demonstram diferentes padrões de eluição devido ao método utilizado. Proteínas com menor afinidade pelo Ni²⁺ presente na resina tendem a serem eluídas em concentrações menores de imidazol. Já proteínas com maior afinidade (como a COMT com a cauda de histidina) tendem a ter maior afinidade pelo Ni²⁺ e somente serem eluídas em altas concentrações de imidazol. Portanto, o método de gradiente crescente tende a eliminar proteínas indesejadas (melhorando a pureza da amostra após a purificação), enquanto o método com eluição de 500 mM imidazol libera de uma só vez todas as proteínas que estavam ligadas ao metal.

Os resultados das diferentes cromatografias de afinidade por níquel foram analisados através de SDS-PAGE 12 % (**Figura 22**).

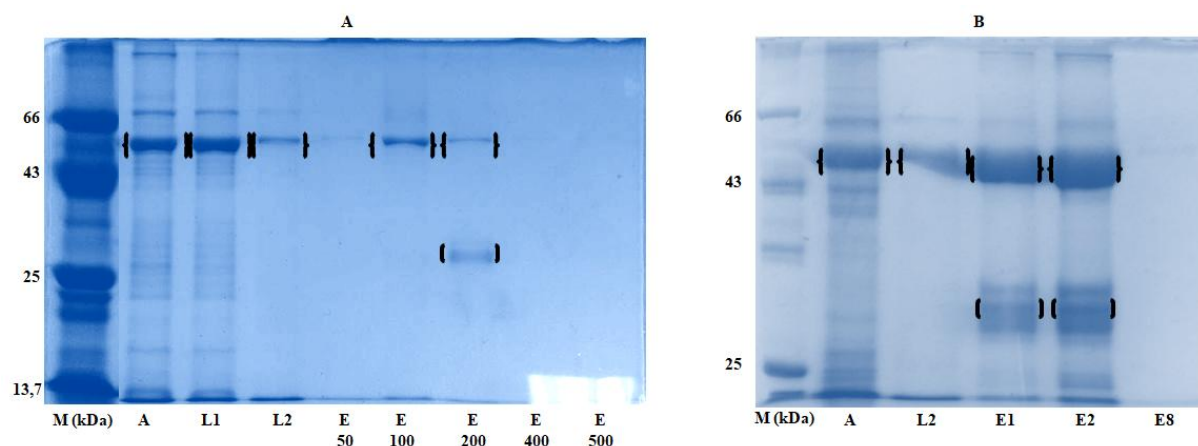


Figura 22. SDS-PAGE 12 % das diferentes eluições por cromatografias de afinidade por níquel realizadas para COMT. A figura apresenta dois géis utilizados para analisar duas diferentes condições de cromatografia por afinidade. A) SDS-PAGE de amostras provenientes de cromatografia por afinidade ao níquel com eluição em gradiente crescente de imidazol (50 a 500 mmol.L⁻¹). B) SDS-PAGE de amostras provenientes de cromatografia por afinidade ao níquel com eluição em passo único de 500 mmol.L⁻¹ de imidazol. A = amostra (fração solúvel da lise bacteriana + 30 mmol.L⁻¹ de imidazol); L1 = 1º intervalo de coleta da lavagem; L2 = 2º intervalo de coleta da lavagem; E 50 = pico da eluição com 50 mmol.L⁻¹ de imidazol; E 100 = pico da eluição com 100 mmol.L⁻¹ de imidazol; E 200 = pico da eluição com 200 mmol.L⁻¹ de imidazol; E 400 = pico da eluição com 400 mmol.L⁻¹ de imidazol; E 500 = pico da eluição com 500 mmol.L⁻¹ de imidazol; E1 = 1º intervalo de coleta da eluição; E2 = 2º intervalo de coleta da eluição; E8 = 8º intervalo de coleta da eluição. M = marcador LBBMP; Banda entre parênteses () = COMT + sítio TEV + His-tag com 33,9 kDa; Banda entre { } = suposta chaperonina Cpn60 da ArcticExpress.

Em ambas as abordagens (com ou sem gradiente), uma proteína na região de aproximadamente 35 kDa aparece no gel de SDS-PAGE. Acredita-se que essa proteína seja a COMT. Porém, em nenhum dos casos a COMT foi a única proteína liberada na eluição. Outra proteína aparece como a principal interferente na região de 60 kDa. Já é descrito na literatura e em fóruns (www.researchgate.net) que a chaperonina Cpn60 (formada por 14 monômeros de aproximadamente 60 kDa) de ArcticExpress pode ser um contaminante em cromatografia por afinidade ao níquel para purificações de proteínas com cauda de histidina.

Por ser uma chaperonina, a característica dessa proteína é que interaja com proteínas nascentes para auxiliar no enovelamento. Belval et al. (2015) descrevem que a região hidrofóbica da Cpn60 pode estar envolvida na ligação e liberação de outras proteínas. Com isso, sugerem que para desfazer essa interação hidrofóbica, entre proteína recombinante e chaperonina, um agente caotrópico pode ser utilizado para expor (abrir) a região hidrofóbica da chaperonina e liberar a proteína recombinante.

Em diversas condições testadas, Belval et al. (2015), encontraram que a utilização de uma lavagem com ureia na cromatografia possibilitou a eluição da Cpn60 de ArcticExpress. Assim, também avaliamos a utilização de ureia 1 mol.L^{-1} no tampão de lavagem com o intuito de separar a Cpn60 que aparece em grandes quantidades na eluição juntamente com a COMT.

Para o teste desse protocolo, uma amostra que já havia sido submetida cromatografia de afinidade (com Cpn60 e COMT), foi aplicada novamente na cromatografia de afinidade. O resultado apresentado não foi satisfatório. No entanto, em seu artigo, Belval et al. (2015) sugerem que a lavagem com ureia é proteína dependente. Sendo assim, outras concentrações de ureia (por exemplo, 1,5, 1 e $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) devem ser testadas.

Após a cromatografia de afinidade as amostras foram dialisadas para retirada do imidazol e posterior cromatografia de gel filtração. A diálise foi realizada com uma membrana de diálise de *Cut off* de 6 a 8 kDa. O tampão utilizado foi 100 mmol.L^{-1} de Tris-HCl pH 8,0 e 500 mmol.L^{-1} de NaCl (sem presença de imidazol). Toda a diálise foi realizada a 4°C e com leve agitação. A amostra dialisada foi submetida a concentração utilizando filtro Vivaspin® Turbo 15 da Sartorius (*Cut off* 10 kDa) a 4°C e 4000 g.

5.2.1.1. Western blot

Para confirmar a expressão e acompanhar a purificação da COMT, foi realizada a técnica de *Western blot* utilizando anticorpo anti-cauda de histidinas (**Figura 23**).

Uma banda na região de 33,9 kDa foi observada no *Western blot* evidenciando a presença de COMT na fração solúvel da lise bacteriana e após a cromatografia de afinidade. Na análise da amostra da proteína concentrada, também é observada uma banda entre as regiões de 50 e 85 kDa. Um possível dímero da COMT resultaria em uma massa aproximada de 67,8 kDa.

A dimerização da COMT observada em SDS-PAGE já foi relatada na bibliografia. Para a COMT solúvel humana, Yao et al. (2003), Cotton e colaboradores (2004) e Li

et al. (2005) observaram o mesmo processo de dimerização da proteína em SDS-PAGE.

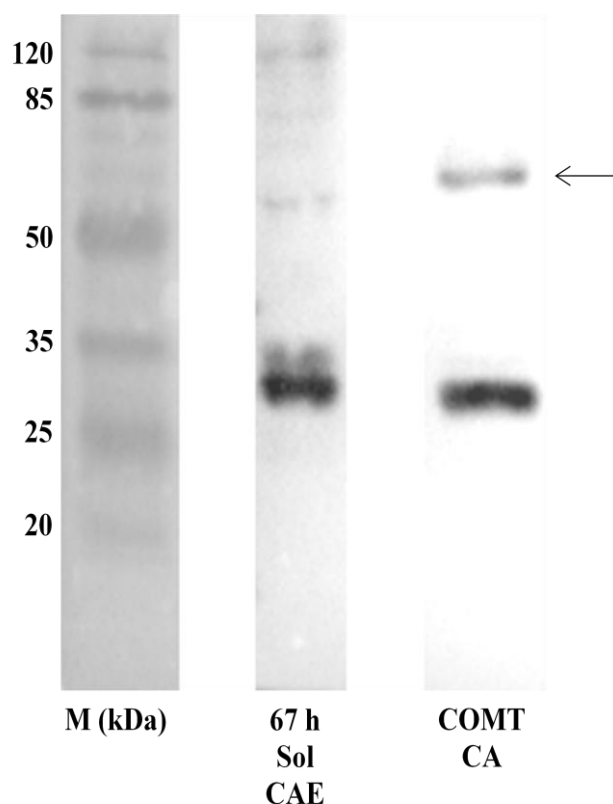


Figura 23. Western blot utilizando anticorpo Anti-His para a expressão e purificação da proteína recombinante COMT. M = *Pierce™ Prestained Protein MW Marker*; 67 h Sol CAE = fração solúvel da lise bacteriana de ArcticExpress obtida em expressão com 67 h de indução; COMT CA = COMT dialisada e concentrada após cromatografia por afinidade ao níquel; ← = possível dímero da COMT.

Cotton e colaboradores (2004) observaram que quando a proteína está em concentrações inferiores a $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ela migra como a proteína monomérica esperada em condições redutoras do SDS-PAGE (presença de 2 mmol.L^{-1} de β -mercaptoetanol). Em concentrações maiores, a proteína migra predominantemente como um dímero e bandas com maiores agregados também são evidentes, o que também parece ser o caso da COMT desse trabalho. A proteína se mantém monomérica nessas condições se forem adicionados de 3 a 10 mmol.L^{-1} de DTT no tampão de eletroforese. Esse resultado sugere que a agregação é resultado da formação de pontes dissulfeto.

Yao e colaboradores (2003) analisaram as duas formas de COMT através de SDS-PAGE não redutor e com diferentes concentrações de espécies reativas de oxigênio.

Eles observaram que quanto maior o ambiente oxidativo, maior a formação de dímeros e maiores os agregados. Quando tratadas com 10 mmol.L⁻¹ de DTT, as amostras migraram normalmente como monômeros. Por conclusão, o ambiente oxidativo tende a formar agregados da COMT através de pontes dissulfeto.

A COMT solúvel humana possui 7 resíduos de cisteína que possibilitam a formação dos agregados através das pontes dissulfeto. Mesmo que a COMT de *Paracoccidioides* possua 4 cisteínas, o resultado do *Western blot* sugere que a formação desses agregados também ocorre nessa proteína.

5.2.2. Cromatografia por gel filtração

5.2.2.1. Ultrahydrogel 250

A amostra obtida após a cromatografia de afinidade foi dialisada e concentrada para ser aplicada em coluna de gel filtração – Ultrahydrogel 250 conectada ao sistema HPLC. A coluna foi previamente equilibrada em tampão 100 mmol.L⁻¹ Tris pH 7,5 e 100 mmol.L⁻¹ NaCl e a proteína foi eluída no mesmo tampão com um fluxo de 0,8 mL/min.

Previamente à purificação da proteína COMT, a coluna Ultrahydrogel 250 da Waters foi calibrada utilizando as seguintes moléculas com massa molecular conhecida: Blue Dextran 2000 (2000 kDa), Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (43 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa), Ribonuclease A (13,7 kDa) e Citocromo C (12,384 kDa), em tampão 100 mmol.L⁻¹ de Tris pH 7,5 e 100 mmol.L⁻¹ de NaCl. Para cada molécula foi calculada a constante K_{av} (obtida através da **equação 01**), que foi utilizada para construir um gráfico K_{av} versus log da massa molecular (**Figura 24**).

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad \text{(Equação 01)}$$

Sendo:

- V_e = volume de eluição do padrão;
- V_o = volume vazio da coluna (medido através do Blue Dextran 2000);
- V_t = volume total da coluna (14,3 mL).

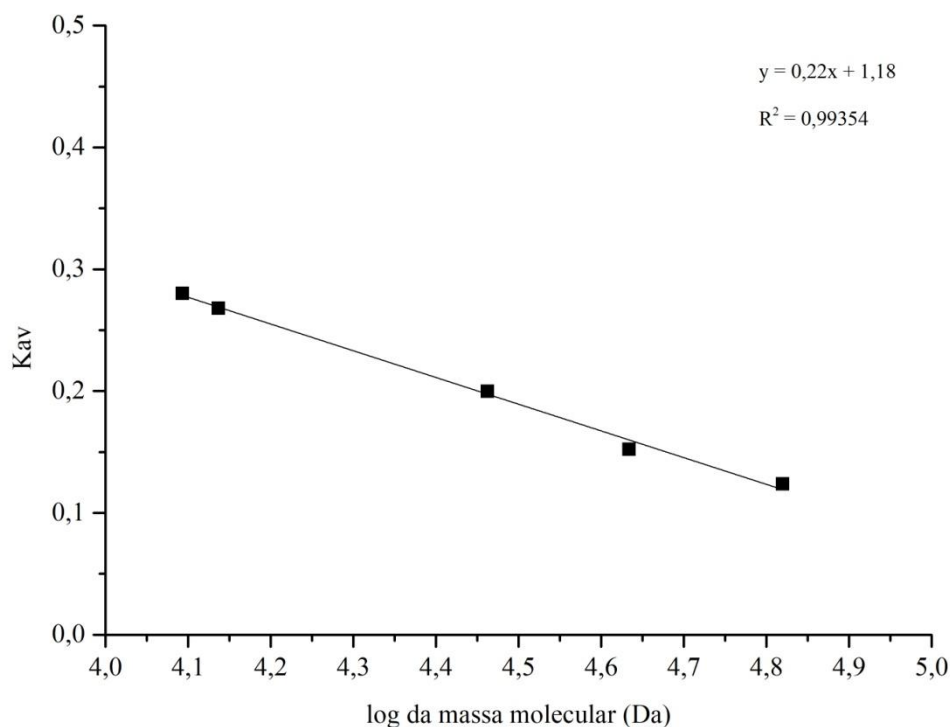


Figura 24. Gráfico Kav versus log da massa molecular para calibração da coluna Ultrahydrogel 250 da Waters para HPLC. A equação da reta obtida após regressão linear dos dados apresentou um R^2 de 0,99354.

Assim, foram aplicados 100 μ L por corrida da amostra de COMT dialisada e concentrada obtida após a eluição da cromatografia de afinidade e o perfil cromatográfico obtido está apresentado na **Figura 25**.

O volume de retenção teórico calculado para COMT monomérica – 33,9 kDa e dimérica – 67,8 kDa foi de 6,922 mL e 6,493 mL, respectivamente (considerando os desvios padrões dos valores da reta = 6,207 a 7,637 mL). Os volumes de retenção dos picos 1, 2 e 3 foram 5,307, 6,600 e 7,120 mL, respectivamente, que corresponderiam a proteínas com massa molecular de 221,9, 49,3 e 26,9 kDa, respectivamente, utilizando a calibração da coluna realizada previamente.

Para os testes de atividade enzimática foram coletadas as amostras dos picos 1, 2 e 3 apresentados na **Figura 25**.

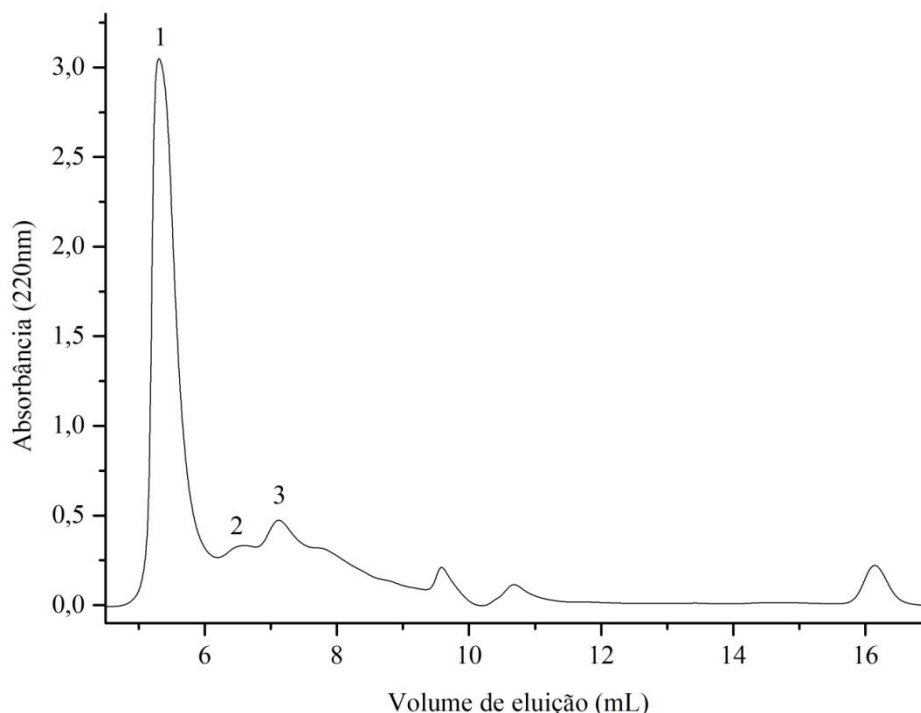


Figura 25. Perfil da purificação da proteína COMT por cromatografia de gel filtração utilizando a coluna Ultrahydrogel 250. A amostra aplicada é proveniente de uma purificação por cromatografia de afinidade. Três picos identificados no cromatograma foram selecionados para coleta e testes posteriores. Os picos foram identificados como 1, 2 e 3. O volume de eluição de cada pico foi: Pico 1 = 5,3 mL; Pico 2 = 6,6 mL; Pico 3 = 7,1 mL.

A coluna Ultrahydrogel 250, que possui uma escala de separação que varia de 1 a 80 kDa, não apresentou resolução suficiente para separação completa das amostras de proteínas, visto que o primeiro pico foi eluído em volume de 5,5 mL, o que corresponderia a uma proteína de massa de 221,9 kDa, maior que o limite de resolução da coluna. Os picos 1, 2 e 3 podem apresentar mistura de proteínas. Mas, de acordo com os cálculos teóricos obtidos com a equação da reta, uma maior quantidade da COMT deverá ser encontrada no pico 2 ou 3. Um gel de SDS-PAGE 12 % foi realizado para analisar o perfil das proteínas obtidas na cromatografia. O resultado é apresentado na **Figura 26**.

Os resultados do SDS-PAGE indicam proteínas presentes na região de 50 a 75 kDa, com uma diminuição da concentração de proteínas nessa região ao longo da eluição. No Pico 1, uma banda na região próxima de 34 kDa também é aparente, o que sugere-se como sendo os monômeros da COMT que interagem com a Cpn60

(resultando em uma massa superior a 90 kDa). Para o Pico 3 GFU, uma outra região próxima a 25 kDa também é observada. Como nenhuma região próxima a 34 kDa é observada nos picos 2 e 3, supõem-se que a COMT possa estar sendo eluída em forma de dímero. Onde o dímero da COMT estaria em maior quantidade no pico 2 (6,6 mL) de acordo com o cálculo teórico (6,5 mL).

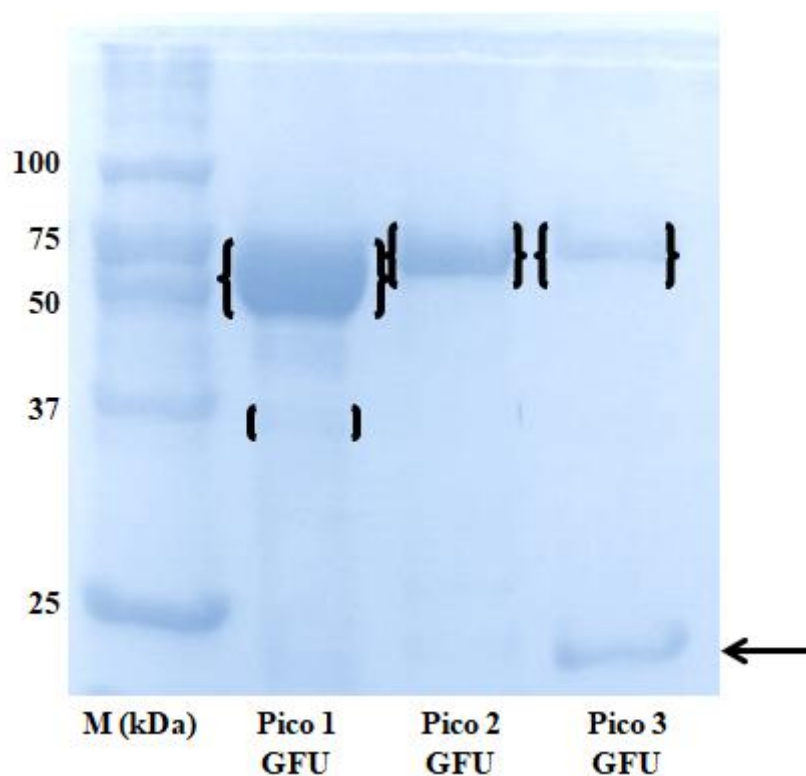


Figura 26. SDS-PAGE 12 % das frações obtidas na cromatografia de gel filtração com coluna Ultrahydrogel 250. O gel apresenta uma maior concentração de proteínas em regiões entre 50 e 75 kDa, com exceção do pico 3 que apresenta outra região com proteínas em aproximadamente 25 kDa. M = *Precision Plus Protein Unstained Standard*™ (BioRad); Pico 1 GFU = pico 1 da cromatografia de gel filtração Ultrahydrogel 250; Pico 2 GFU = pico 2 da cromatografia de gel filtração Ultrahydrogel 250; Pico 3 GFU = pico 3 da cromatografia de gel filtração Ultrahydrogel 250. Banda entre parênteses () = COMT + sítio TEV + His-tag com 33,9 kDa; Banda entre { } = Cpn60 ou dímero da COMT. ← = banda na região de 25 kDa.

As amostras dos picos 1, 2 e 3 foram coletadas e concentradas para serem avaliadas quanto à atividade enzimática.

5.2.2.2. Superose 12 10/300

A coluna Superose 12 10/300, por ter um volume maior (24 mL) e uma faixa de resolução entre 1 e 300 kDa, foi utilizada para tentar melhorar a separação entre os picos e permitir a aplicação de um volume maior de amostra, com consequente

maior concentração de proteína nas frações obtidas. A coluna foi previamente equilibrada em tampão 100 mmol.L^{-1} de Tris pH 8,0, 100 mmol.L^{-1} de NaCl e 10 mmol.L^{-1} de MgCl_2 e foram injetados $500 \mu\text{L}$ da amostra de COMT proveniente da cromatografia de afinidade com um fluxo de $0,3 \text{ mL.min}^{-1}$. As frações foram eluídas no mesmo tampão e fluxo (**Figura 27**).

Além disso, dois padrões também foram aplicados na coluna: a albumina (66 kDa), que apresentou um V_e de 12,56 mL e o citocromo C (12,3 kDa), com V_e de 15,37 mL.

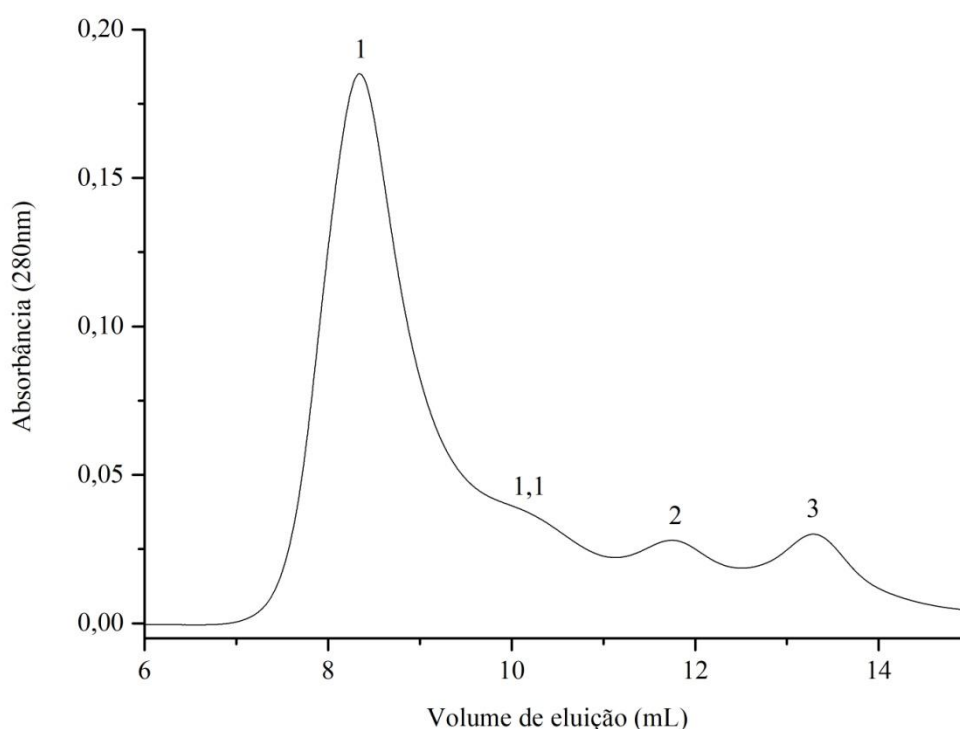


Figura 27. Perfil da purificação da proteína COMT por cromatografia de gel filtração utilizando a coluna Superose 12. A amostra aplicada é proveniente de uma purificação por cromatografia de afinidade. Três picos identificados no cromatograma foram selecionados para coleta e testes posteriores. Os picos foram identificados como 1, 2, e 3. O volume de eluição de cada pico foi: Pico 1 = 8,34 mL; Pico 2 = 11,74 mL; Pico 3 = 13,29 mL. A região 1,1 também foi coletada separada, apesar de não possuir um pico definido.

O perfil cromatográfico ficou bastante semelhante ao da coluna Ultrahydrogel, no entanto, a Superose 12 permitiu a aplicação de um volume maior de amostra. As relações de volume de eluição e massa são apresentadas na **Tabela 2**.

Depois de coletadas, as amostras dos picos 1, 1.1, 2 e 3 foram concentradas em filtros Vivaspín® Turbo 15 da Sartorius (*Cut off* 10 kDa) a 4 °C e 4000 *g* e foram analisadas em gel SDS-PAGE 12% (**Figura 28**).

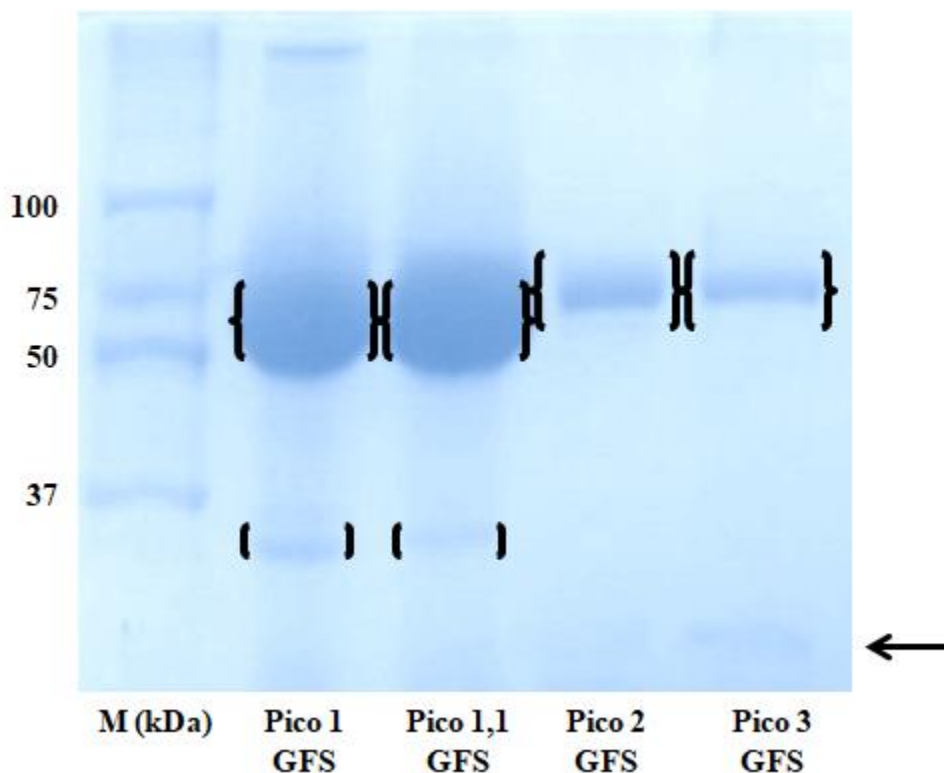


Figura 28. SDS-PAGE 12 % das frações obtidas na cromatografia de gel filtração com coluna Superose 12. O gel apresenta uma maior concentração de proteínas em regiões entre 50 e 75 kDa. Proteínas com massa próxima a 37 kDa aparecem nos picos 1 e 1.1, e proteínas com massas mais inferiores aparecem no pico 3. M = *Precision Plus Protein Unstained Standard*™ (BioRad); Pico 1 GFS = pico 1 da cromatografia de gel filtração Superose 12; Pico 1.1 GFS = pico 1.1 da cromatografia de gel filtração Superose 12; Pico 2 GFS = pico 2 da cromatografia de gel filtração Superose 12; Pico 3 GFS = pico 3 da cromatografia de gel filtração Superose 12. Banda entre parênteses () = COMT + sítio TEV + His-tag com 33,9 kDa; Banda entre { } = Cpn60 ou dímero da COMT. ← = banda na região de 25 kDa.

Tabela 2. Comparação entre os volumes de eluição dos picos da Superose 12 e as massa dos padrões. A calibração da coluna ainda não foi completada, por isso, não foi possível calcular as massas referentes aos picos.

Padrão/Pico	Volume de eluição (mL)	Massa do padrão (kDa)
Pico 1 COMT	8,34	
Pico 1,1 COMT	≈ 10	
Pico 2 COMT	11,74	
Albumina	12,56	66
Pico 3 COMT	13,29	
Citocromo C	15,37	12,3

Os resultados obtidos nas duas cromatografias sugerem que a COMT esteja na forma de dímero. Na Ultrahydrogel 250, o pico 2 é eluído em um volume de 6,6 mL,

sendo que o valor teórico calculado para o dímero seria de 6,5 mL, uma boa aproximação. Já para a cromatografia na Superose 12, o pico 2 foi eluído em volume de 11,74 mL, valor menor que o volume da eluição para a albumina, que foi de 12,56 mL, ou seja, o pico 2 da Superose corresponde a uma proteína com massa maior que a da albumina (66 kDa), sendo que o dímero da COMT tem massa teórica de 67,8 kDa.

Os picos 1 e 1.1 da Superose 12 também apresentam proteínas com massas um pouco inferiores a 37 kDa. Suspeita-se que essas proteínas possam ser COMT de *Paracoccidioides* que ainda não foram ou foram enoveladas corretamente, mas que ainda estariam interagindo com a Cpn60 de ArcticExpress. Na cromatografia, a interação entre essas proteínas (Cpn60 + COMT) diminuiria o volume necessário para a eluição em gel filtração. Esse fato poderia explicar a atividade encontrada nos picos 1 e 1.1 nos ensaios enzimáticos. Sendo que, o pico 2 (possível dímero), seria a estrutura quaternária final da proteína, apresentando maior atividade em relação às outras frações.

5.3. Caracterização bioquímica e biofísica

5.3.1. Ensaio enzimático

5.3.1.1. Padronização do ensaio

Um primeiro teste de atividade enzimática foi realizado utilizando tempo de reação de 30 min e temperatura de 35 °C com adição de 1 mL de cada reagente de parada, exatamente como descrito por Dhar & Rosazza (2000). Nesse ensaio (Ensaio 1), o volume final da reação foi de 1 mL em tampão 100 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl pH 7,5 e 100 mmol.L⁻¹ de NaCl e foram utilizados 100 µL da amostra enzimática proveniente dos diferentes picos da gel filtração (**Tabela 3**).

Tabela 3. Ensaio enzimático para COMT (Ensaio 1). Primeiro teste para adaptação do ensaio enzimático para COMT de *Paracoccidioides*. Foram utilizadas amostras provenientes dos 3 primeiros picos obtidos na cromatografia de gel filtração com a coluna Ultrahydrogel 250. GFU = Gel filtração Ultrahydrogel 250.

Amostra	Pico 1 (GFU)	Pico 1 (GFU)	Pico 2 (GFU)	Pico 3 (GFU)
Concentração de proteína (A280 nm) (mg.mL ⁻¹)	0,00466	0,00344	0,00202	0,00144
Diferença: Absorbância branco – amostra (510 nm)	0,0420	0,0179	0,0569	0,0135
A510/[Enzima]	9,013	5,203	28,168	9,375

Ao final das reações, as amostras provenientes dos três picos da gel filtração - Ultrahydrogel apresentaram atividade, sendo que o maior consumo de substrato ocorreu quando uma amostra do pico 2 foi utilizada na reação. Também foi observado o aumento do consumo de substrato de acordo com o aumento da concentração de proteínas no pico 1 da gel filtração (Ultrahydrogel 250).

Outro teste (Ensaio 2) foi realizado aumentando o tempo de reação para 45 minutos e o volume de amostra enzimática para 500 µL, mantendo-se todos os outros parâmetros. O volume final de reação após a adição dos reagentes de parada foi diluído duas vezes para que a leitura da A510 entrasse na faixa linear de absorbância (**Tabela 4**).

Tabela 4. Ensaio enzimático para COMT (Ensaio 2). Segundo teste para adaptação do ensaio enzimático para COMT de *Paracoccidioides*. Foram utilizadas amostras provenientes da cromatografia de afinidade e do pico 1 da cromatografia de gel filtração com a coluna Ultrahydrogel 250. O branco foi realizado com água tipo I. GFU = Gel filtração Ultrahydrogel 250; CA = Cromatografia de afinidade.

Amostra/Branco	CA	Pico 1 (GFU)	Branco
Concentração de proteína (A280 nm) (mg.mL ⁻¹)	0,0179	0,00860	-
Absorbância (510 nm) antes da diluição	1,451	1,639	1,651
Absorbância (510 nm) após diluição	0,731	0,768	0,867
Diferença: Absorbância branco – amostra (510 nm)	0,136	0,099	-
A510(diluída)/[Enzima]	7,577	11,512	-

Com os resultados desse segundo ensaio, foi possível observar a necessidade da diluição para a leitura da absorbância ficar dentro da faixa linear e, proporcionalmente, um aumento da razão diferença de A510nm/[enzima] da cromatografia de afinidade para a gel filtração.

Por fim, com o intuito de diminuir a quantidade de enzima e reagentes utilizados, todos os volumes dos componentes do ensaio foram proporcionalmente reduzidos para um volume reacional final de 200 µL. Após 45 minutos de reação, foram utilizados 200 µL de cada reagente de parada.

Após a parada, as reações também foram diluídas duas vezes para que a leitura da A510 entrasse na faixa linear de absorbância (entre 0,1 e 1). Após 20 minutos, uma segunda leitura foi realizada para avaliar se os valores da A510 se mantinham estáveis (**Tabela 5**).

Tabela 5. Ensaio enzimático para COMT (Ensaio 3). Terceiro teste para adaptação do ensaio enzimático para COMT de *Paracoccidiodies*. Foi utilizada a amostra provenientes da cromatografia de gel filtração com a coluna Ultrahydrogel 250. O branco foi realizado com água tipo I. O volume reacional foi reduzido para 200 µL. A estabilidade da cor na solução foi observada. GFU = Gel filtração Ultrahydrogel 250.

Amostra/Branco	Pico 1 (GFU)	Branco
Concentração de proteína (A280 nm) (mg.mL ⁻¹)	0,0086	-
Absorbância (510 nm) antes da diluição	1,496	1,373
Absorbância (510 nm) após a diluição	0,240	0,264
A510(diluída) após 20 min	0,237	0,253
Diferença: Absorbância branco – amostra (510 nm)	0,024	-
A510(diluída)/[Enzima]	2,791	-

Através dos dados obtidos no terceiro ensaio enzimático, foi possível observar que o ensaio padrão de Dhar e Rosazza (2000) pode ser reduzido para um volume reacional menor. Além disso, em relação à estabilidade da cor da solução, os autores relatam uma mudança entre o fim da reação e os próximos 5 minutos e que depois, de 5 min até 1 h, a cor se mantém estável. No ensaio 3, após 20 minutos da parada da reação, os valores de A510 não alteraram. Esse fato é importante visto que o espectrofotômetro utilizado nas leituras está em outro laboratório.

5.3.2. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da proteína

A fim de verificar a estabilidade termodinâmica da enzima COMT em função da temperatura, a fração 2 da Superose 12 foi submetida a um ensaio de desnaturação térmica com monitoramento de absorbância durante o experimento e os resultados estão dispostos na **Figura 29**.

A análise das curvas de desnaturação térmica foram realizadas utilizando dois comprimentos de onda, monitorando especificamente os resíduos de aminoácidos triptofano e tirosina, já que a proteína de interesse não possui o resíduo de triptofano. Assim, através desta análise foi possível observar que existe ainda na fração selecionada a contribuição não mensurada de outras moléculas. Como pode ser observado na **Figura 29** a absorção da fração proteica não se altera com a variação da temperatura até aproximadamente 320 K e a partir desta temperatura, ao invés da absorção diminuir, sua intensidade aumenta por um fator de 3,5 vezes. Assim, com esta alteração no estado de absorção para o estado desnaturado, pode se supor que a população de moléculas presente nas temperaturas acima de 320 K encontraram uma via termodinâmica mais favorável ao sistema e formaram

possivelmente um agregado ou um aglomerado estável (estado nativo compacto). Portanto, o resultado preliminar indica que acima de 320 K as proteínas presentes em solução iniciam processo de aglomeração ou desnaturação sendo essa temperatura limite para os ensaios posteriores. Esses resultados serão realizados novamente com uma fração mais pura.

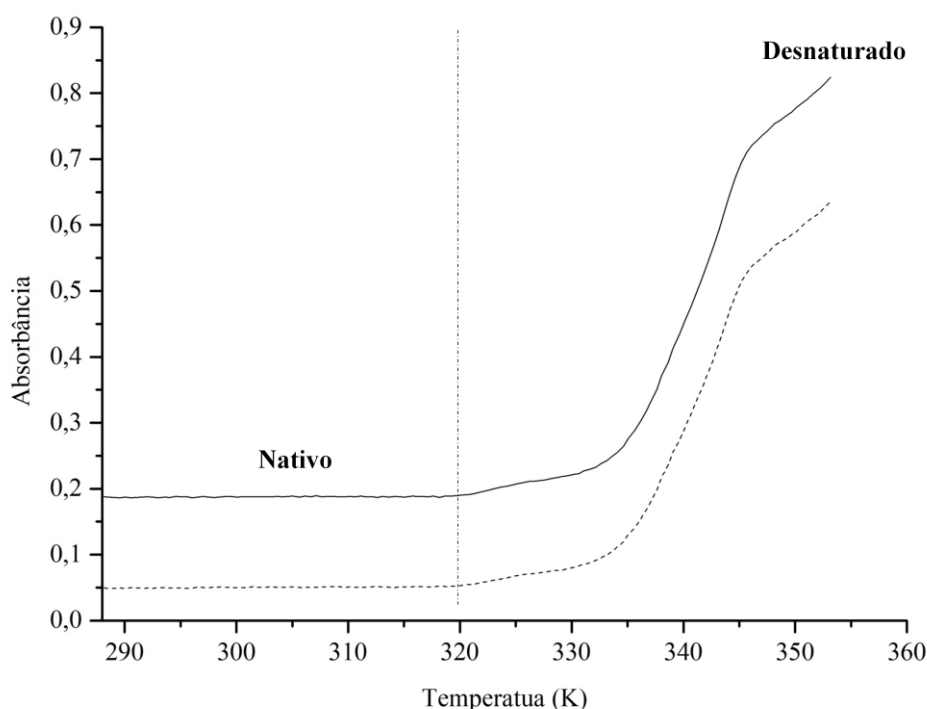


Figura 29. Desnaturação térmica da enzima COMT a $0,17 \text{ mg.mL}^{-1}$, em 100 mmol.L^{-1} Tris pH 8,0, 100 mmol.L^{-1} NaCl e 10 mmol.L^{-1} MgCl_2 . Varredura de 290 a 370 K e scan rate de 1.0 K.min^{-1} , com monitoramento a 280 nm (linha sólida) e 293 nm (linha tracejada).

5.4. Caracterização estrutural

5.4.1. Dicroísmo circular

A fração 2 obtida na cromatografia utilizando a Superose 12 foi submetida a análise de dicroísmo circular no Laboratório de espectroscopia e calorimetria (LEC) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO) em Campinas. O resultado é apresentado na **Figura 30**.

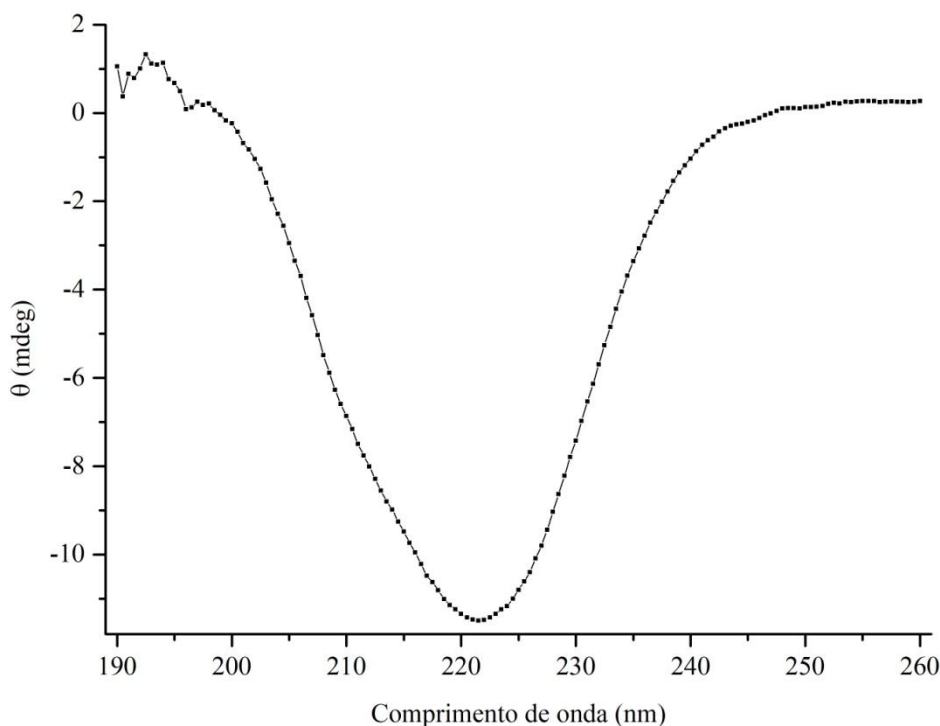


Figura 30. Dicroísmo circular da fração 2 da COMT obtida na cromatografia de gel filtração. As regiões positivas em 193 nm e negativas em 208 e 222 indicam a presença de α -hélices. Regiões positivas em 198 nm e negativas próximas a 215 nm indicam presença de folha- β . Perfil típico de proteínas enoveladas.

Os dados obtidos foram transformados de θ (mdeg) para elipticidade molar pela **Equação 02**. Esses valores foram analisados no programa CDNN para obtenção da porcentagem de cada estrutura secundária presente na amostra. Os resultados são apresentados na **Tabela 6**.

$$\text{Elipticidade molar} = \frac{\theta}{10 \cdot \left(\frac{aa \cdot 1000 \cdot [enz]}{MW} \right) \cdot l} \quad \text{(Equação 02)}$$

Onde:

- θ = mdeg;
- aa = número de resíduos de aminoácidos da proteína;
- [enz] = concentração da enzima em solução ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$);
- MW = massa molecular da proteína (Da);
- l = caminho óptico da cubeta (cm).

Tabela 6. Porcentagem de estruturas secundárias da COMT. Estimativa das estruturas secundárias presentes na COMT (fração 2 da Superose). As estimativas são apresentadas em porcentagens relativas a quantidade de α -hélices, folhas- β e *random coils*.

Estrutura	%
α -Hélice	12,83
Folha β	39,91
<i>Random coil</i>	47,26

Os 15 modelos da estrutura tridimensional de COMT, na presença dos cofatores SAM e Mg^{2+} , possuem em média 31,63% de α -hélice, 19,73% de folha- β e 48,64% de *random coil*. Para a COMT de *Paracoccidioides*, os valores de *random coil* estão coerentes com os outros modelos, já as hélices e folhas aparecem em proporções inversas. Essa inversão na porcentagem das folhas e das hélices pode ser uma característica da COMT em *Paracoccidioides*, ou até em fungos, tendo em vista que todos os 15 modelos são provenientes de mamíferos e nenhum modelo de COMT para fungos foi depositado no PDB até o momento.

Por último, a COMT de *Paracoccidioides* ainda não foi totalmente purificada. Sendo assim, outras proteínas podem estar contribuindo para o resultado obtido no dicroísmo circular.

5.5. Estudos de bioinformática da proteína COMT

Devido as baixas expressões da COMT e a necessidade de grandes quantidades de proteína para a cristalografia de raio-X, um modelo teórico da proteína foi desenvolvido para que o estudo *in silico* de inibidores seja realizado e possa guiar os experimentos. A seleção racional de um inibidor para a COMT é processo crucial para o desenvolvimento de uma droga, caso a proteína demonstre ser um alvo para o tratamento da PCM.

5.5.1. Alinhamento local

Para construir um modelo de proteína por homologia, primeiramente é necessário que sejam obtidas proteínas com estruturas resolvidas e que compartilhem homologia com a COMT de *Paracoccidioides*. Assim, um alinhamento local pelo BLAST foi realizado somente para sequências de proteínas com estruturas tridimensionais resolvidas e depositadas no PDB. Para isso, foram gerados 24 melhores alinhamentos. Devido ao alto *E-value* (9,1) e o baixo *score* (28,5), o 24º

alinhamento foi descartado. Para todos os outros 23 alinhamentos, os valores dos *E-values* e *scores* foram considerados satisfatórios. O código PDB e as pontuações de todas as proteínas modelos utilizadas são dispostos na **Tabela 7**.

Tabela 7. Código PDB e pontuação das proteínas selecionadas pelo BLAST para o alinhamento. O resultado obtido pelo alinhamento do BLAST para COMT de *Paracoccidioides* com o banco de dados do PDB é apresentado na tabela. O *Score*, a cobertura da sequência em relação a COMT, o *E-value* e a identidade entre as sequências da COMT e as modelos são apresentados. Em negrito estão destacadas as COMT humanas.

Código PDB	Score	Cobertura da sequência	E-value	Identidade
4P58	133	57%	1,00E-37	39%
2ZLB, 2ZVJ, 2ZTH, 3A7D	133	64%	1,00E-37	37%
1JR4, 1H1D, 2CL5 (A-B), 1VID, 3HVV, 3HVI, 3HVJ (A-B), 3HVK, 3NW9, 3NWB, 3S68, 4P7G (A-D), 4P7J, 4P7K, 4PYL, 5LQC, 5LQR, 5LQU (A-B), 5P95, 5P96, 5P97, 5P98, 5P99, 5P9A, 5P9B, 5P9C, 5P9D, 5P9E, 5P9W, 5PA1	133	64%	1,00E-37	37%
5K0C (A-B), 5K0E	131	64%	8,00E-37	37%
5K0F (A-B)	131	64%	8,00E-37	37%
5K0B (A-H)	131	64%	8,00E-37	37%
3OE4, 3OE5, 3OZR, 3OZS, 3OZT, 3NWE, 3R6T, 3U81, 4PYM, 4PYN, 4PYO (A-B), 4PYQ (A-B), 5LQK, 5LR6 (A-D), 5P8W (A-C), 5LQJ (A-D), 5LQN, 5P8X, 5P8Y, 5P8Z, 5P90, 5P91, 5P92, 5P93, 5P94, 5P9N, 5P9O, 5P9P, 5P9Q, 5P9R (A-B), 5P9S, 5P9T, 5P9U, 5P9V, 5P9X, 5P9Y, 5P9Z, 5PA2, 5PA3, 5PA4, 5PA5, 5PA6, 5PA7 (A-B)	131	64%	8,00E-37	37%
5K0G (A-B), 5K0J (A-B)	131	64%	8,00E-37	37%
5FHR (A-B)	130	64%	9,00E-37	36%
5K09 (A-X)	130	64%	9,00E-37	37%
5K0L (A-D)	130	64%	1,00E-36	37%
5K0N (A-D)	131	64%	1,00E-36	37%
5FHQ, 5LQA	130	64%	1,00E-36	36%
5K05 (A-B)	129	64%	5,00E-36	36%
5K01, 5K03	129	64%	6,00E-36	36%
4P7F	129	57%	7,00E-36	37%
5PA0	128	64%	9,00E-36	36%
3BWW	126	65%	4,00E-35	35%
4XUE (A-B)	125	65%	7,00E-35	35%
3A7E	125	65%	7,00E-35	35%
3BWM	125	65%	7,00E-35	35%
4XUC, 4XUD	125	64%	9,00E-35	35%
4PYI, 4PYJ, 4PYK, 5LSA	125	65%	1,00E-34	35%

Através destes alinhamentos, o algoritmo também prediz domínios proteicos, os quais fornecem a região da sequência de aminoácidos da proteína de interesse onde está o domínio característico de uma catecol O-metiltransferase (**Tabela 8**). De acordo com o BLAST, a sequência de aminoácidos de 17 a 213 da COMT de *Paracoccidioides* caracterizam a proteína como uma O-metiltransferase e a sequência de 82 a 192 é característica de um domínio de metiltransferase.

Tabela 8. Predição de domínio e famílias pelo BLAST. O BLAST identificou regiões características de O-metiltransferases na sequência de aminoácidos da COMT de *Paracoccidioides*.

Nome	Acesso	Descrição	Intervalo	E-value
YrrM	COG4122	O-metiltransferase predita	17 - 213	4,35E-18
Methyltrasnf_24	pfam13578	Domínio de metiltransferase	82 - 192	3,32E-15

Com todas as 23 sequências alinhadas em relação à COMT de *Paracoccidioides* foi possível determinar resíduos e regiões conservadas na estrutura primária da proteína. Os aminoácidos com conservação $\geq 65\%$ são encontrados entre os resíduos de 17 a 205, região essa característica de O-metiltransferases (**Tabela 9**).

Tabela 9. Aminoácidos conservados na COMT de *Paracoccidioides*. A tabela informa os aminoácidos conservados na COMT de *Paracoccidioides* de acordo com o alinhamento das proteínas modelos fornecidas pelo BLAST. As porcentagens de conservação são apresentadas em cores. Azul = 100%; Verde = 96%; Amarelo = 91%; Cinza = 74%; Rosa = 70%; Vermelho = 65%.

Sequencia de aminoácidos da COMT									
MMGVDRPYLP	KPETHCGDGR	EVELLQYIYS	LPNLEELRGS	PSKIVEAIDQ					
YGRDNYLLMN	VGSVKGPIIT	SLIAAVKPQV	MVELGGYVGY	SAILFGDAVR					
KAGGKRYYSL	EKDPVFGAVS	TLLINLAGLG	DFVQVIIGPS	DISLYNLHRS					
GTINRIDLLF	LDHYKPAYVV	DLKLCEQLGM	IVPGSILAAD	NVISPGNPPY					
LKYVRSNVEE	KRHEAASNPA	ACRGYDLRGF	SKSIINRYGI	SGEKAMTAVS					
ISGNPNLIYE	SRLVNSFEPT	GEPDGVEITR	CIGTARTSIS	KL					

Esses resíduos e regiões conservadas na proteína podem fornecer informações a respeito do local de ligação de cofatores e substratos. Assim, foram analisadas, dentre as 23 diferentes sequências de aminoácidos propostas pelo BLAST, aquelas cujos modelos cristalográficos continham SAM e Mg^{2+} . Neste caso, 80 possuem Mg^{2+} e 15 possuem SAM na estrutura cristalizada (todos os cristais com SAM também possuem Mg^{2+}).

Os modelos que possuem os dois cofatores foram analisados em relação à interação dos cofatores com os resíduos da estrutura primária. As proteínas depositadas no PDB selecionadas foram: 4XUC, 4XUD e 4XUE (HARRISON et al., 2015); 3BWY e 3BWM (RUTHERFORD et al., 2009); 5FHR e 5FHQ (LAW et al., 2016); 1VID (VIDGREN et al., 1994); 1H1D (BONIFACIO et al., 2002); 2CL5 (PALMA et al., 2006); 2ZTH (TSUJI et al., 2009); 2ZVJ (TSUJI et al., 2009); 3S68 (ELLERMANN et al., 2016); 3A7E e 5LSA (dados de diferentes autores, porém ambos não foram publicados até o momento). A molécula de SAM é apresentada com numeração na **Figura 31** e as ligações realizadas são apresentadas na **Tabela 10**. A **Tabela 10** contém informações à respeito do aminoácido ou molécula envolvido na interação, o quanto esse aminoácido foi conservado (informação da **Tabela 9**), o cofator que está interagindo com o aminoácido ou molécula, a ocorrência com que essa interação acontece nos modelos utilizados, o local onde a interação ocorre e a frequência com que ocorre neste local, e o tipo de interação que é realizada.

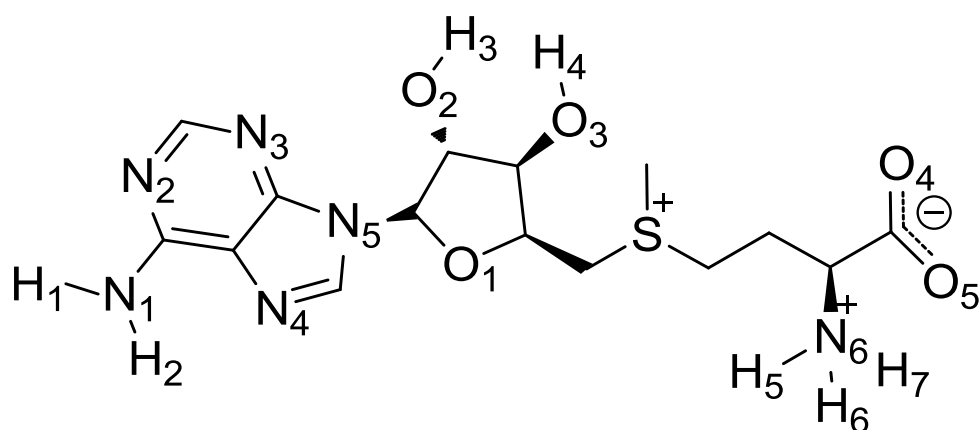


Figura 31. Molécula de SAM. Numeração dos átomos para identificação das regiões de interação com a proteína.

Através das informações apresentadas na **Tabela 10**, que foram obtidas com os 15 modelos analisados, foi realizada uma predição das interações entre cofatores e outras moléculas (H_2O e substrato ou inibidor) com a COMT de *Paracoccidioides*. As predições são mostradas nas **Figura 32** (SAM) e **Figura 33** (Mg^{2+}). Essas predições dos aminoácidos que interagem com cofatores da COMT podem auxiliar na

construção do modelo fornecendo uma base para as corretas interações que devem ser obtidas.

Tabela 10. Interações preditas entre os cofatores e a proteína COMT de *Paracoccidioides*. Na tabela são fornecidos os aminoácidos ou moléculas analisadas, a conservação deste, qual o cofator, a ocorrência, o local de interação do aminoácido (aa) ou da molécula, o local de interação do cofator ou coordenações e o tipo de interação.

Aminoácido ou molécula	Conservação	Cofator	Ocorrência*	LI ² aa ou molécula (frequência)	LI ² cofator ou coordenações (frequência)	Tipo de interação
V61	100%	SAM	93%	NH da cadeia principal (100%)	O4 (100%)	Ponte de hidrogênio
G85	100%	SAM	100%	O= da cadeia principal (100%)	H6 (80%) ou H5 (20%)	Ponte de hidrogênio
S91	100%	SAM	100%	OH da cadeia lateral (100%)	H7 (93%) ou H5 (7%)	Ponte de hidrogênio
S91	100%	SAM	80%	NH da cadeia principal (100%)	O5 (100%)	Ponte de hidrogênio
E111	100%	SAM	100%	COO- da cadeia lateral (100%)	H3 (100%) e H4 (100%)	Ponte de hidrogênio
S140	96%	SAM	100%	NH da cadeia principal (100%)	N2 (100%)	Ponte de hidrogênio
S140	96%	SAM	73%	OH da cadeia lateral (100%)	H1 (100%)	Ponte de hidrogênio
D162	100%	SAM	100%	COO- da cadeia lateral (100%)	H5 (73%) ou H6 (20%) ou H7 (7%)	Ponte de hidrogênio
D162	100%	Mg ²⁺	100%	COO- da cadeia lateral (100%)	1 coordenação (100%)	Interação metálica
H163	100%	SAM	100%	Anel imidazol da histidina (100%)	Região próxima ao S (67%) ou anel purínico (33%)	Hidrofóbica
D190	100%	Mg ²⁺	100%	COO- da cadeia lateral (100%)	1 coordenação (100%)	Interação metálica
N191	100%	Mg ²⁺	93%	O= da cadeia lateral (100%)	1 coordenação (100%)	Interação metálica
H ₂ O		Mg ²⁺	100% ¹	O (100%)	1 coordenação (100%)	Interação metálica
Substrato ou inibidor		Mg ²⁺	100% ¹	O <i>m</i> e <i>p</i> no anel catecol (100%)	2 coordenações (100%)	Interação metálica

*Ocorrência da interação relativa aos 15 modelos utilizados.

¹100% dos casos em que existe a presença da molécula no modelo cristalizado.

²LI = Local de interação.

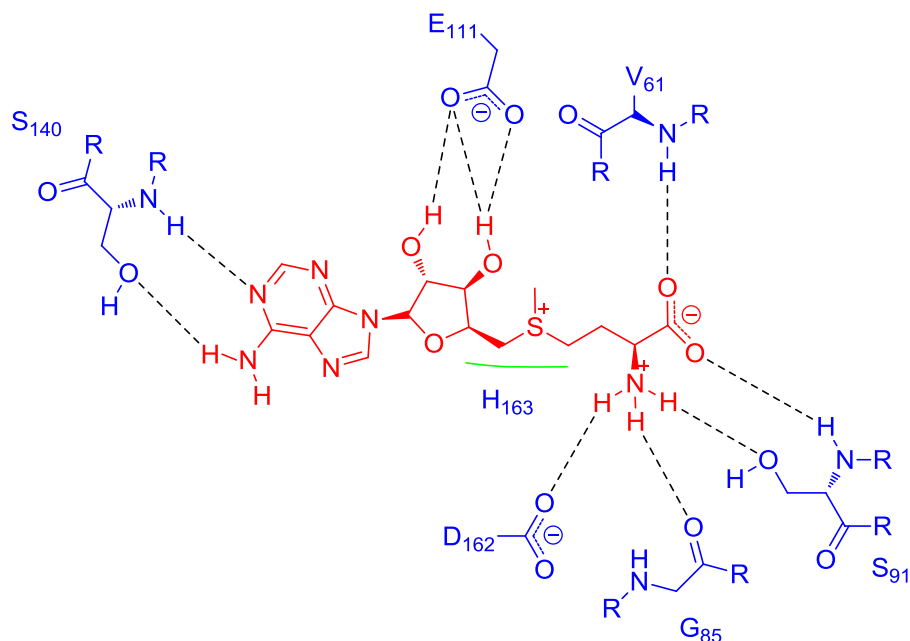


Figura 32. Predição das interações entre a molécula de SAM e os aminoácidos da COMT de *Paracoccidioides*. As predições foram realizadas de acordo com os modelos obtidos no PDB após o processo de triagem no BLAST. Em vermelho: SAM; em azul: aminoácidos da COMT de *Paracoccidioides*; linhas tracejadas em preto: interações do tipo ponte de hidrogênio; e em verde: interações do tipo hidrofóbicas.

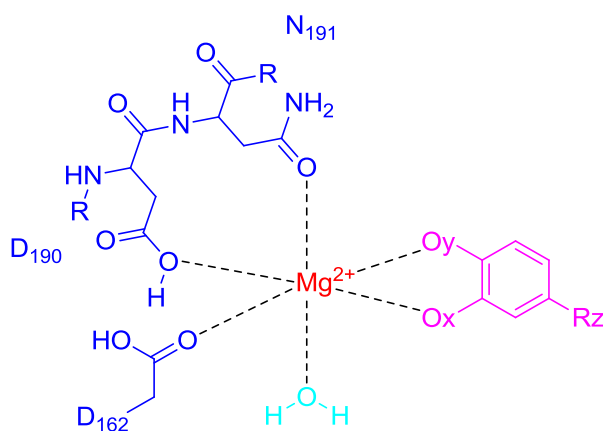


Figura 33. Predição das interações entre o íon de Mg^{2+} e os aminoácidos da COMT de *Paracoccidioides*. As predições foram realizadas de acordo com os modelos obtidos no PDB após o processo de triagem no BLAST. Em vermelho: íon de Mg^{2+} ; em azul escuro: aminoácidos da COMT de *Paracoccidioides*; em azul claro: molécula de água; em rosa: substrato ou inibidor (y e x podem ser variações de grupos funcionais ou cadeias, mas sempre na presença do oxigênio interagindo com o Mg^{2+} , e z representa o restante da cadeia do substrato ou inibidor); e linhas tracejadas em preto: interações metálicas.

5.5.2. Predição da estrutura secundária

Os três softwares utilizados geraram informações individuais a respeito da estrutura secundária da COMT de *Paracoccidioides*. Através destes resultados, foi determinada uma estrutura consenso entre os 3 programas. Os resultados são

apresentados na **Tabela 11**, que se baseia na estrutura consenso e seus números de estruturas secundárias e localizações.

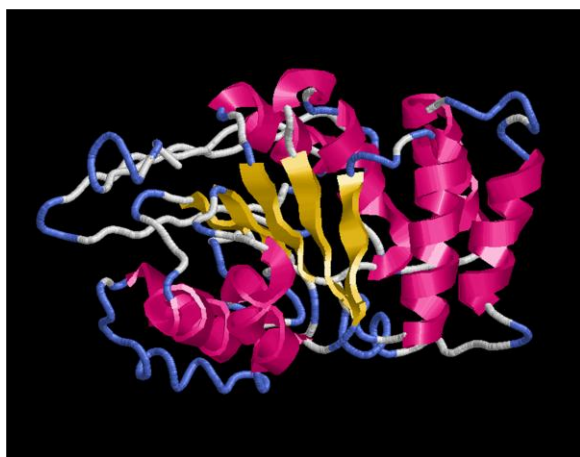
Tabela 11. Número e localização das estruturas secundárias preditas. Foram preditas 9 α -hélices e 7 folhas- β . Além disso, outra região de estrutura secundária também foi encontrada, porém, não definida como α -hélice ou folha- β na estrutura consenso.

Estrutura	Quantidade predita	Localizações
α -hélice	9	21-29
		41-53
		65-75
		90-98
		116-126
		141-149
		198-206
		208-215
		80-84
Folha β	7	106-110
		133-137
		158-160
		169-177
		186-189
		257-263
		275-280
Não definida	1	230-235

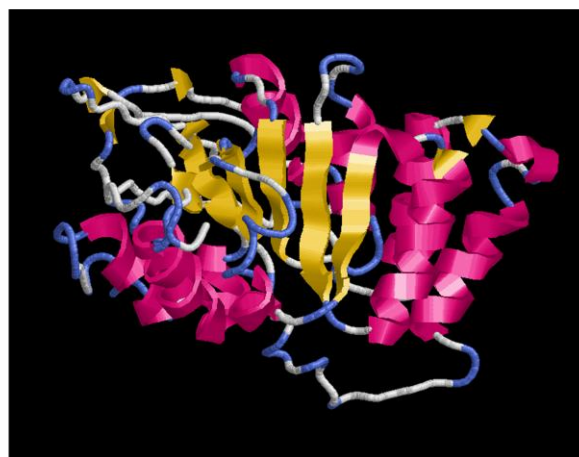
A região não definida na estrutura consenso pode ser uma α -hélice, pois dois programas apontam esses aminoácidos constituindo uma α -hélice e um indica uma folha- β . Além disso, as COMTs cristalizadas até hoje possuem essa configuração de 7 folhas- β . Esses fatos indicam que a estrutura secundária geral deve possuir 10 α -hélices e 7 folhas- β . Com esses resultados, a estimativa é de que 28,57 % da estrutura secundária seja α -hélice, 20,00 % folha- β e 51,43 % de *random coil*. Os valores de *random coil* se aproximam dos encontrados pelo CD. Porém, para α -hélices e folhas- β , a estimativa segue os resultados das proteínas modelos e não o do CD da fração 2 da COMT.

5.5.3. Modelagem molecular

A modelagem molecular realizada no I-TASSER gerou cinco possíveis estruturas para a COMT de *Paracoccidioides*. As quatro melhores estruturas obtidas são apresentadas na **Figura 34**. Para selecionar a melhor estrutura, que será utilizada nos estudos de *docking* e previsões biofísico estruturais, os modelos devem passar por validação e minimização de energia em passos posteriores.



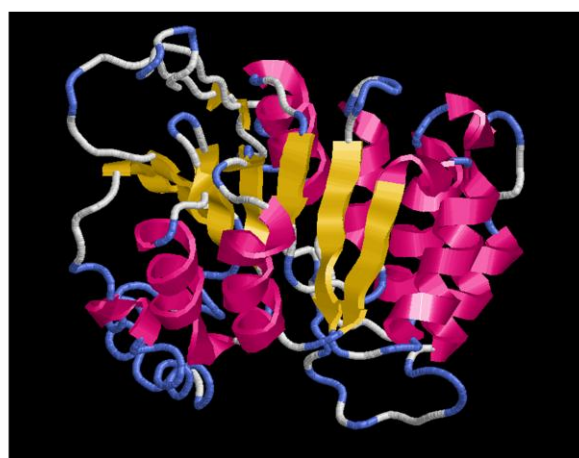
Modelo 01



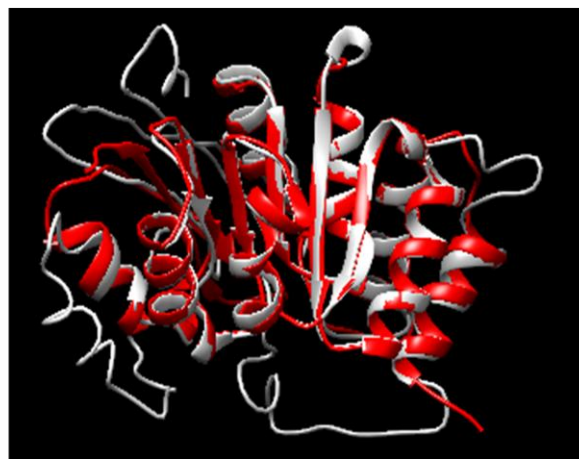
Modelo 02



Modelo 03



Modelo 04



Comparação entre modelo 01 I-TASSER (cinza) e COMT humana 3BWY (vermelho)

Figura 34. Modelos obtidos no I-TASSER para COMT de *Paracoccidioides*. A figura apresenta os cinco modelos gerados pelo I-TASSER. Em todos os modelos é possível observar a região central constituída de folhas- β com α -hélices ao redor. Motivo estrutural característico do *Rossmann like fold*. Também são mostrados na figura dois ângulos de visão diferentes da sobreposição do modelo 01 do I-TASSER com a COMT humana 3BWY. Em cinza o modelo gerado pelo I-TASSER e em vermelho a COMT humana.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1. Expressões heterólogas

Através do perfil de expressão da COMT de *Paracoccidiodies* em diversos organismos foram possíveis de se obter algumas informações.

Em primeiro lugar, a temperatura parece ser o fator primordial para o correto enovelamento da proteína e sua expressão na fração solúvel. Em nenhuma das cepas utilizadas a proteína conseguiu ser expressa em temperaturas superiores a 18 °C. Mesmo que os protocolos para obtenção de proteína solúvel no LBBMP não tenham apresentados resultados satisfatórios para as cepas Rosetta e Rosetta-gami a 18 °C, para ArcticExpress a 12 °C a expressão solúvel foi possível em nosso laboratório. Para os 3 casos, as condições de lises foram iguais. Sugerindo que a uma menor temperatura possibilite uma maior produção de proteínas com o correto enovelamento.

A diminuição da temperatura pode levar na diminuição da agregação devido à taxa de alongamento das cadeias polipeptídicas serem menores e a formação de agregados ser favorecida em altas temperaturas pela característica temperatura dependente das interações hidrofóbicas (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Em segundo lugar, os resultados das expressões demonstram que a influência dos tRNAs na expressão da COMT de *Paracoccidiodies* não é significativa para sua expressão na fração solúvel. A possibilidade de expressão da COMT na fração solúvel da lise bacteriana em ArcticExpress é a prova disso.

Em terceiro lugar, A proteína parece não necessitar da formação de pontes dissulfeto para expressão na fração solúvel. Outras cepas além da Rosetta-gami foram capazes de expressar a proteína corretamente.

Por último, resta descobrir se o aumento da concentração da proteína na expressão será um fator que levará a uma maior formação de agregados. Como as maiores expressões são obtidas a 37 °C, não sabemos se altas expressões em baixas temperaturas levarão ou não à formação de agregados. Esse teste poderá ser

respondido após confirmação dos resultados da expressão heteróloga de COMT em ArcticExpress com presença de etanol no meio de cultura.

6.2. Purificações

As duas purificações (gradiente crescente e gradiente único de imidazol) por cromatografia de afinidade resultaram em semelhantes frações de purificações quando analisadas em SDS-PAGE. Nos dois tipos de eluição, duas regiões do gel de SDS-PAGE apresentaram maior concentração de proteínas: a região de 60 kDa e a de 30 kDa. Na região de 60 kDa existe a possibilidade de estar sendo eluída a chaperonina Cpn60 de ArcticExpress (60 kDa) ou o dímero da COMT (67,8 kDa) ou uma mistura das duas proteínas. Para região de 30 kDa, acredita-se que a enzima de *Paracoccidioides* que esteja sendo eluída (33,9 kDa). Porém, o resultado do *western blot* indica a presença da COMT de *Paracoccidioides* nas duas regiões do SDS-PAGE. Alguns autores indicam que esse dímero da COMT apresentado no gel, não necessariamente é um dímero em solução, eles seriam formados somente por pontes dissulfeto formadas nas condições desnaturantes do gel (YAO et al., 2003; COTTON; STODDARD; PARSON, 2004; LI et al, 2005).

Após os resultados das purificações por cromatografia de afinidade, as amostras foram purificadas mais uma vez, agora por cromatografia de gel filtração. Novamente, para as duas colunas utilizadas (Ultrasphere 250 e Superose 12) o perfil da eluição foi semelhante. Em ambos os casos, uma maior atividade enzimática foi encontrada no segundo pico das cromatografias (fração 2). O volume de eluição dessa fração 2 é próximo ao do padrão de albumina (66 kDa) utilizado para as calibrações. Esses dados indicam para que a COMT esteja presente também como dímero (67,8 kDa) em solução, e não só no SDS-PAGE. A proteína na região de 60 kDa no gel de SDS-PAGE também foi observada.

Ao final, algumas hipóteses são possíveis:

- A COMT (dímero ou monômero) e a chaperonina estão juntas em solução;
- Somente a COMT está presente em solução, na forma de dímero;
- A COMT está presente como monômeros e dímeros em solução.

6.3. Atividade enzimática

A metodologia de Dhar e Rosazza (2000) foi adaptada para a COMT de *Paracoccidioides*. O método possibilita o uso de baixas concentrações de enzima, o que é necessária devido para o estudo, devido as baixas concentrações obtidas após as expressões heterólogas. O pico 2 da cromatografia por gel filtração foi a fração da cromatografia que obteve maior atividade enzimática. Esse dado suporta a hipótese de que a COMT esteja sendo eluída em forma de dímero. Visto que o volume de eluição nas cromatografias se aproximam do teórico para uma proteína com 67,8 kDa (dímero da COMT).

6.4. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da proteína

A absorção da fração proteica não foi alterada com a variação da temperatura até aproximadamente 320 K e a partir desta temperatura, a população de moléculas formou possivelmente um agregado ou um aglomerado estável (estado nativo compacto), indicando que essa temperatura, possivelmente, é a limite para os ensaios enzimáticos posteriores.

6.5. Dicroísmo circular

A fração 2 da COMT, obtida por purificação de gel filtração em uma coluna Superose 12, apresentou porcentagem iguais de *random coil* em relação às outras COMTs disponíveis no PDB. Porém, a quantidade de α -hélice e folha- β foram invertidas. Essa fração da COMT de *Paracoccidioides* apresenta uma maior porcentagem de folha- β do que α -hélice. Esse resultado pode ser por causa da proteína realmente ter diferentes porcentagens de estruturas secundárias quando comparada com as outras COMTs do PDB (que são de mamíferos, planta e bactéria) ou pelo fato de que outras proteínas presentes na fração não totalmente pura estejam interferindo no resultado final do CD.

6.6. Análise *in silico*

Os aminoácidos que interagem com os cofatores das COMT foram preditos para a enzima em *Paracoccidioides*. Esses aminoácidos podem guiar os estudos de *docking* para o desenho de inibidores para a proteína. A predição da estrutura

secundária e terciária geraram modelos com homologia para as COMTs disponíveis no PDB. Mas se a diferença na estrutura secundária, obtida no CD for confirmada, o modelo terá de ser reajustado para realização dos ensaios de inibição *in silico*.

7. CONCLUSÕES

- A expressão heteróloga da COMT de *Paracoccidioides* se mostrou mais viável por ArcticExpress em nosso laboratório, porém são obtidas baixas quantidades de enzima;
- As purificações sugerem a presença da Cpn60 de ArcticExpress como contaminante;
- As purificações também sugerem a COMT como um dímero em solução;
- A atividade enzimática foi encontrada como sendo maior na fração referente ao dímero da COMT;
- A faixa de trabalho da fração 2 pode ser até 320 K;
- O dicróismo circular identificou a possibilidade de um perfil diferente de estrutura secundária da COMT de *Paracoccidioides* em relação às outras COMTs existentes no PDB;
- O modelo *in silico* deverá ser ajustado de acordo com os resultados de CD de uma amostra pura da COMT.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar ensaios de *Western blot* com anticorpo anti-cauda de histidinas para as frações obtidas após a cromatografia de gel filtração;
- Testar novas concentrações de ureia para retirada da Cpn60 na purificação por cromatografia de afinidade.
- Avaliar a solubilidade da COMT obtida através da expressão com etanol em ArcticExpres;
- Avaliar a expressão nas cepas Rosetta e Rosetta-gami
- Caracterizar a COMT recombinante no que diz respeito ao pH ótimo, T ótima, constantes cinéticas K_m , $V_{m\acute{a}x}$, k_{cat} e k_{cat}/K_m ;
- Estudar a inibição da COMT recombinante;
- Determinar a estrutura tridimensional da COMT por cristalografia de raios-X.

9. REFERÊNCIAS

- ARNOW, L. E. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalaninetyrosine mixtures. **Compare A Journal Of Comparative Education**. p. 531-537, 1937.
- AVERBECK, N. et al. Identification and characterization of PaMTH1, a putative O methyltransferase accumulating during senescence of *Podospora anserina* cultures. **Current Genetics**. v. 37, n. 3, p. 200-208, 2000.
- AXELROD, J.; TOMCHICK, R. Enzymatic O-Methylation of Epinephrine and Other Catechols. **J. Biol. Chem.** v. 233, n. 3, p. 702-705, 1958.
- BAGAGLI, E. et al. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**. v. 165, n. 4-5, p. 197-207, 2008.
- BASTOS, K. P. et al. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC microbiology**, v. 7, p. 29, 2007.
- BELVAL, L. et al. A fast and simple method to eliminate Cpn60 from functional recombinant proteins produced by *E. coli* Arctic Express. **Protein Expression and Purification**. 2015.
- BESSETE, P. H. et al. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. **PNAS**. v. 96, n. 24, p. 13703-13708, 1999.
- BIALEK, R. et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in Tissue Samples by a Nested PCR Assay. **Journal of clinical microbiology**. v. 38, n. 8, p. 2940-2942, 2000.
- BONIFÁCIO, M. J. et al. Kinetics and Crystal Structure of Catechol-O-Methyltransferase Complex with Co-Substrate and a Novel Inhibitor with Potential Therapeutic Application. **Molecular Pharmacology**. v. 62, n. 4, p. 795-805. 2002.
- BRÄNDÉN, C., I. Relation between structure and function of a/b proteins. **Quart.Rev. Biophys.** v. 13, p. 317-338, 1980.
- BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**. v. 32, n. 5, p. 1288-1296, 2009.
- CARNEIRO, F. R. G. et al. Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1. **Biochem.Biophys Research Communications**, v. 343, p. 260–268, 2006.
- CARRILLO-MUNÓZ, A. J. et al. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Rev Esp Quimioterap**. v. 19, n. 2, p. 130-139, 2006.

CARVALHO, K. C. et al. Use of recombinant gp43 isoforms expressed in *Pichia pastoris* for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, p. 622–629, 2008.

CHENG, X.; BLUEMENTHAL, R. M. S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions. **World Scientific Publishing**. 1999.

CHHETRI, G.; KALITA, P.; TRIPATHI, T. An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. **MethodsX**. v. 2, p. 385-391, 2015.

CORREDOR, G. G. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micología**. p. 216-220. 1999.

COSTA, C. S. et al. Transporters in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome: insights on drug resistance. **Genetics and Molecular Research**. v. 4, n. 2, p. 390-408, 2005.

COTTON, N. J. H.; STODDARD, B.; PARSON, W. W. Oxidative Inhibition of Human Soluble Catechol-O-methyltransferase. **The journal of biological chemistry**. v. 279, n. 22, p. 23710-23718, 2004.

COWARD, J. K. Chemical mechanisms of methyl transfer reactions: comparison of methylases with nonenzymic 'model reactions'. In Salvatore, F., Borek, E., Zappia, V., Williams-Ashman, H.G. and Schlenk, F. (eds), *The Biochemistry of Adenosylmethionine*. **Columbia University Press**, New York. 1977. p. 127–144.

COWARD, J. K.; SWEET, W. D. Kinetics and Mechanism of Methyl Transfer from Sulfonium Compounds to Various Nucleophiles. **J. Org. Chem.** v. 36, n. 16, p. 2337-2346, 1971.

DA SILVA, S. H. M. et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4480–4486, 2004.

DESJARDINS, C. A. et al. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. **PLoS genetics**, v. 7, n. 10, 2011.

DÍEZ, S. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, p. 359–365, 2002.

DHAR, K.; ROSAZZA, J. P. N. Purification and Characterization of *Streptomyces griseus* Catechol O-Methyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*. v.66, n. 11, p. 4877-4882, 2000.

ELLERMANN, M. et al. Catechol-O-methyltransferase in complex with substituted 3'-deoxyribose bisubstrate inhibitors. **Acta Crystallographica**. p. 253-260. 2012.

FAUMAN, E., B.; BLUMENTHAL, R., M.; CHENG, X. Structure and Evolution of AdoMet-Dependent Methyltransferases. In: CHENG, X.; BLUMENTHAL, R. M. S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions. **World Scientific Publishing**. 1999. p. 1-38.

FERNANDES, V. C. et al. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Immunological Methods**, v. 367, p. 78–84, 2011a.

FERNANDES, V. C. et al. Additive effect of rPb27 immunization and chemotherapy in experimental paracoccidioidomycosis. **PLoS ONE**. v. 6, 2011b.

FERNANDES, V. C. et al. The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, v. 13, p. 1062–1072, 2011c.

FERRER, M. et al. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. **Nature Biotechnology**. v. 21, n. 11, p. 1266-1267, 2003.

FERRER, M. et al. Functional consequences of single:double ring transitions in chaperonins: life in the cold. **Molecular Microbiology**. v. 53, n. 1, p. 167-182, 2004.

FIGUEROA, J. I. et al. Isolation and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* 58 kDa extracellular glycoprotein which is recognized by human immune sera. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**. v. 89, p. 566-572, 1995.

FORTES, M. R, P. et al. Imunologia da paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 86, n. 3, p. 516-525. 2011.

FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 20, n. 2, p. 129-132, 1987.

GOLDANI, L. Z.; SUGAR, A. M.. Short report: use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 58, n. 2, p. 152-153, 1998.

GOLDANI, L. Z.; WIRTH, F. Animal Models and Antifungal Agents in Paracoccidioidomycosis: An Overview. **Mycopathologia**. 2017.

GOMES, G. M. et al. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, n. 9, p. 3478-3480, 2000.

GROCOTT, R. G. A stain for fungi in tissue sections and smears. Using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 25, p. 975-979, 1955.

HAHN, R. C. et al. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**. v. 46, p. 324–329, 2003.

HARRISON, S. T. et al. Synthesis and Evaluation of Heterocyclic Catechol Mimics as Inhibitors of Catechol-O methyltransferase (COMT). **ACS Medicinal Chemistry Letters**. p. 6-11. 2015.

KINNINGS, S. et al. Drug discovery using chemical systems biology: repositioning the safe medicine Comtan to treat multi-drug and extensively drug resistant tuberculosis. **PLoS Computational Biology**. v. 5, n. 7, 2009.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica**. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LAW, B. J. C. et al. Effects of Active-Site Modification and Quaternary Structure on the Regioselectivity of Catechol-O-Methyltransferase. **Angewandte Chemie International Edition**. p. 2683-2687. 2016.

LEBENDIKER, M.; DANIELI, T. Production of prone-to-aggregate proteins. **FEBS Letters**. v. 588, p. 236-246, 2014.

LENHARD-VIDAL, A et al. Paracoccidioides brasiliensis and P. lutzii antigens elicit different serum IgG responses in chronic paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5-6, p. 345–52, dez. 2013.

LI, Y. et al. Functional and structural comparisons of cysteine residues in the Val108 wild type and Met108 variant of human soluble catechol O-methyltransferase. **Chemico-Biological Interactions**. v. 152, p. 151-163, 2005.

LUTZ, A. Uma micose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hiphoblastomicoses americanas. **Bras-Med**. v. 22, p. 121–124, 1908.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis. **Clinics in dermatology**. v. 30, n. 6, p. 610–615, 2012.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **Anais brasileiros de dermatologia**. v. 88, n. 5, p. 700-711, 2013.

MARTINEZ, R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 57, n. 1, p. 11-20, 2015.

MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **Journal of fungi**. v. 3, n. 1, p. 1-13, 2017.

MENDES, R. P. Paracoccidioidomicose (Blastomicose Sul-americana) – Quadro clínico. In: FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 3ª Ed. São Paulo: Editora Athene; p. 1381-1388, 2005.

MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**. p. 224-282, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Proposta de Vigilância Epidemiológica da Paracoccidioidomicose**. Brasília, 2012.

MORETO, T. C. et al. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 105, n. 8, p 473-478, 2011.

MUÑOZ, J. F. et al. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. **Ecological and Evolutionary Science**. v. 1, n. 5, p. 1-18, 2016.

OLIVEIRA, H. C. et al. *Paracoccidioides* host Interaction: An Overview on Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, p. 1-20, 2015.

PALMA, P. N. Comparative Study of *ortho*- and *meta*-Nitrated Inhibitors of Catechol-O-methyltransferase: Interactions with the Active Site and Regioselectivity of O-Methylation. **Molecular Pharmacology**. v. 70, n. 1, p. 143-153. 2006.

PEÇANHA, P. M. **Aspectos epidemiológicos e clínicos da Paracoccidioidomicose no Estado do Espírito Santo**. [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2012.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycosis as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: Review from 1996 to 2006. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 104, p. 513-521, 2009.

PUCCIA, R. et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect Immun**. v. 53, n. 1, p. 199-206, 1986.

RESTREPO, A.M., ARANGO, M.D. In Vitro Susceptibility Testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to Sulfonamides. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 18, n. 1, p. 190-194, 1980.

REZENDE, T. C. V et al. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 572–587, 2011.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**. v. 5, 2014.

RUTHERFORD, K. et al. Crystal Structures of Human 108V and 108M Catechol O-Methyltransferase. **Journal of Molecular Biology**. p. 120-130. 2008.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: RL, C. R. C. (Ed.). **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**. New York: Marcel Dekker, 2001.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**. v. 165, p. 183-195, 2008.

SANTOS, W. et al. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de caso-controle no Estado do Espírito Santo. **Caderno Saúde Pública**. v. 19, n. 1, p. 245-253, 2003.

SHIKANAI-YASUDA, M. Paracoccidioidomycosis treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 57, n. 1, p. 31-37, 2015.

SHIKANAY-YASUDA, M. et al. Consensus Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 50, p. 715-740, 2017.

SLABINSKI, L. et al. XtalPred: A web server for prediction of protein crystallizability. **Bioinformatics**. v. 23, n. 24, p. 3403-3405, 2007.

SOARES, C. M. A. et al. A Centennial: Discovery of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**. v. 165, p. 179-181, 2008.

SRINIVASAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; RAMASUBRAMANIAN, A. K. Overcoming antifungal resistance. **Drug Discovery Today: Technologies**. v. 11, p. 65-71, 2014.

SWINDELLS, M. B. Classification of doubly wound nucleotide binding topologies using automated loop searches. **Protein Science**. v. 2, p. 2146-2153, 1993.

TABORDA, C. et al. Paracoccidioidomycosis: challenges in the development of a vaccine against an endemic mycosis in the Americas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 57, n. 1, p. 21-24, 2015.

TAVARES, A et al. Transcriptomic reprogramming of genus *Paracoccidioides* in dimorphism and host niches. **Fungal Genetics and Biology**. v. 81, p. 98-109, 2015.

TSUJI, E. et al. Crystal structures of the Apo and Holo form of rat catechol-O-methyltransferase. **Journal of Structural Biology**. v. 165, n. 3, p. 133-139. 2009. a.

TSUJI, E.; OKAZAKI, K.; TAKEDA, K. Crystal structures of rat catechol-O-methyltransferase complexed with coumarine-based inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 378, n. 3, p. 494-497. 2009. b.

VESER, J. Kinetics and inhibition studies of catechol O-methyltransferase from the yeast *Candida tropicalis*. **Journal of bacteriology**. n. 24, p. 3696-3700, 1987.

VIANA, P. A et al. Spectroscopic and thermodynamic properties of *Debaryomyces hansenii* UFV-1 α -galactosidases. **International journal of biological macromolecules**. v. 46, n. 3, p. 298–303, 2010.

VIDAL, M. S. M. et al. Atypical Serological Response Marked by a Lack of Detectable Anti-gp43 Antibodies in a Patient with Disseminated Paraco. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 3014–3016, 2005.

VIDGREN, J. et al. Catechol O-Methyltransferase. In: CHENG, X.; BLUEMENTHAL, R. M. S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions. **World Scientific Publishing**. 1999. p. 55-91.

VIDGREN, J.; SVENSSON, L. A.; LILJAS, A. Crystal structure of catechol O-methyltransferase. **Nature**. v. 368, n. 24, p. 354-358, 1994.

VIEIRA, N. F. R. **Contribuição para o Estudo da Paracoccidioidomicose Infecção no Estado do Espírito Santo. Provas Intradérmicas à Paracoccidioidina, Histoplasmina e PPD.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 1979.VIEIRA, 1979 apud SANTOS 2003.

WANKEL, B.; AIDÊ, M. A. Capítulo 6 – Paracoccidioidomicose. **J. bras. pneumol.** São Paulo. v. 35, n. 12, 2009.

YAO, J. et al. Catechol Estrogen 4-Hydroxyequilenin Is a Substrate and an Inhibitor of Catechol-O-Methyltransferase. **Chem. Res. Toxicol.** v. 16, p. 668-675, 2003.

APÊNDICE A

Informações obtidas pelo ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

COMT sem sítio TEV e cauda de histidina:

- Número de aminoácidos: 292;
- Massa molecular: 31883,6 Da;
- pI teórico: 6,45;
- Coeficiente de extinção: $26820 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ com todos os resíduos de cisteínas reduzidos;
- Índice alifático: 99,79.

COMT com sítio TEV e cauda de histidina:

- Número de aminoácidos: 308;
- Massa molecular: 33883,76 Da;
- pI teórico: 6,60;
- Coeficiente de extinção: $28310 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ com todos os resíduos de cisteínas reduzidos;
- Índice alifático: 95,88.